

**Aus dem medizinischen Zentrum für Humangenetik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik**

**des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg**

**Nachweis von Deletionen der
Tumorsuppressorgene TP53 und p16
mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung bei
erwachsenen Patienten mit Philadelphia-Chromosom-
positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Thomas Morosan, geb. Hasenburg
aus Wipperfürth**

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg am 19.10.2006.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. H. Rieder

Correferent: Prof. Dr. R. Müller

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Definition der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)
- 1.2 Unterteilung der ALL
 - 1.2.1 zellmorphologische Einteilung der ALL (FAB Klassifikation)
 - 1.2.2 zytochemische Einteilung der ALL
 - 1.2.3 immunologische Einteilung der ALL (EGIL-Klassifikation)
 - 1.2.4 zytogenetische Einteilung der ALL
 - 1.2.5 Einteilung nach dem Erkrankungsalter
- 1.3 Inzidenz und Epidemiologie der akuten lymphatischen Leukämie
- 1.4 Ätiologie und Pathogenese
- 1.5 Klinik und Prognose der akuten lymphatischen Leukämie
- 1.6 Das Philadelphia Chromosom
- 1.7 Das Tumorsuppressorgen TP53
 - 1.7.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene
 - 1.7.2 Historie von TP53
 - 1.7.3 Charakteristika von TP53
 - 1.7.4 TP53 bei Leukämien
- 1.8 Das Tumorsuppressorgen p16
 - 1.8.1 Cycline, cyclinabhängige Kinasen und deren Inhibitoren
 - 1.8.2 p16 bei Leukämien
- 1.9 Fragestellung

2. Material und Methoden

- 2.1 Patienten
 - 2.1.1 Zur Herkunft der Patientenproben
 - 2.1.2 Alters- und Geschlechterverteilung
 - 2.1.3 Klinisches Krankheitsstadium
 - 2.1.4 Klassifikation der ALL der Studienpatienten
 - 2.1.4.1 FAB-Klassifikation
 - 2.1.4.2 Cytochemische Klassifikation
 - 2.1.4.3 Cytogenetische Klassifikation

- 2.1.4.4 Immunologische Klassifikation
- 2.1.4.5 Molekularzytogenetische Klassifikation durch FISH
- 2.2 Material
- 2.3 Geräte und verwendete Chemikalien (siehe Anhang)
- 2.4 Methoden
 - 2.4.1.1 Vorbemerkungen zur Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)
 - 2.4.1.2 Prinzip und Ablauf der FISH
 - 2.4.1.3 Empfindlichkeit der FISH
 - 2.4.2 Aufarbeitung der Proben
 - 2.4.2.1 Kulturmedien
 - 2.4.2.2. Zellkultivierung
 - 2.4.2.3 Präparation der Metaphasechromosomen nach Kultivierung
 - 2.4.3.1 Herkunft und Herstellung der Gensonde für p16
 - 2.4.3.2 Ansetzen der PAC-Kultur
 - 2.4.3.3 PAC-DNA-Aufreinigung nach Qiagen-Plasmid-Maxiprep-Protokoll®
 - 2.4.4 Markierung der Sonde (Nick Translation) und Hybridisierung
 - 2.4.5 Vorbereitung der weiteren Sonden für die Hybridisierung
 - 2.4.6 Vorbereitung der Objekträger für die Hybridisierung
 - 2.4.7 Detektion
- 2.5 Visuelle Auswertung der Proben
- 2.6 Methodik der statistischen Auswertung

3. Ergebnisse

- 3.1 Vorbemerkungen
- 3.2. Häufigkeit von p16-Aberationen bei Ph+-ALL
 - 3.2.1 Homozygote Deletionen
 - 3.2.2 Hemizygoten Deletionen
 - 3.2.3 9p-Aberrationen
 - 3.2.4 Untersuchung eines Rezidivpatienten mit Ph+-ALL auf p16-Deletionen
 - 3.2.5 Zusammenhang von p16-Deletionen mit dem Immunophänotyp
 - 3.2.6 Zusammenhang von p16-Deletionen mit dem Patientenalter
- 3.3.1 Häufigkeit von TP53-Deletionen bei Ph+-ALL
- 3.3.2 Häufigkeit weiterer TP53-Aberrationen

3.3.3 Zusammenhang von TP53-Deletionen mit dem Immunphänotyp und dem Patientenalter

3.4 Divergierende Befunde in FISH und Zytogenetik und deren Bedeutung

4. Diskussion

4.1.1 Häufigkeit von p16-Deletionen bei der Ph+-ALL des Erwachsenen

4.1.2 Zusammenhang von 9p-Deletionen mit dem Verlust von p16

4.1.3 Zusammenhang von p16-Deletionen bei Ph+-ALL mit dem Immunphänotyp

4.1.4 Zusammenhang von p16-Deletionen bei Ph+-ALL mit dem Patientenalter

4.1.5 Diskussion von divergierenden Befunden in FISH und Zytogenetik und deren Bedeutung

4.2 Häufigkeit von TP53-Deletionen bei der Ph(+)-ALL des Erwachsenen

4.2.1 Zusammenhang von TP53-Deletionen bei Ph+-ALL mit dem

Immunphänotyp und dem Patientenalter

4.3 Diskussion der Ausschlusskriterien der Signalauswertung

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Anhang

7.1 Verbrauchsmaterialien

7.1.1 Materialien zur Aufarbeitung der Proben

7.1.1.1 Materialien zur PAC-Klonierung und Aufarbeitung

7.1.1.2 Materialien zur Nick-Translation

7.1.1.3 Materialien zur Hybridisierung/Detektion

7.1.1.4 Gensonden

7.1.1.5 Detektionssysteme

7.1.2 Geräte und sonstige Materialien

7.2 Daten zur FISH-Auswertung

8. Danksagung

9. Ehrenwörtliche Erklärung

10. Akademische Lehrer

11. Lebenslauf

1. Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie ist eine bösartige Erkrankung, die vom blutbildenden Knochenmark ausgeht und unbehandelt innerhalb kurzer Zeit zum Tod führt. Dank moderner Therapien sind inzwischen Heilungsraten von bis zu 75% bei Kindern und 40% bei Erwachsenen erreicht worden. Die Erkenntnis, dass es sich nicht um eine uniforme Krankheit, sondern um eine Gruppe mit differenzierbaren Untergruppen handelt, hat mit der Entwicklung von maßgeschneiderten, risikoadaptierten Therapien einen großen Teil zu der gebesserten Prognose der ALL beigetragen {Hoelzer 1994} {Faderl et al. 2000} {Faderl et al. 2003}.

Insbesondere die Entdeckung von sogenannten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen als Ursachen der Krebsentwicklung hat in den letzten 20 Jahren das Wissen um die Entstehung der Leukämien und vieler anderer Tumoren revolutioniert. Inzwischen ist bekannt, dass die meisten Tumoren durch ein charakteristisches Muster von genetischen Veränderungen gekennzeichnet sind {Hollstein et al. 1991} {Cline 1994} {Kamb et al. 1994} {Sherr 1996} {Strachan 1996} {Drexler 1998}.

1.1 Definition der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)

Der Begriff „Leukämie“ (*griechisch*: weißes Blut) wurde 1844 von Rudolf Virchow (1821-1902) geprägt und entstand durch die verbreiterte weißliche Leukozytenmanschette, die bei dem zentrifugierten Blut eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) und sehr hohen Leukozytenzahlen zu beobachten war {Lathan et al. 1994}.

Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Knochenmarks. Die klinische Erscheinungsform der einzelnen Leukämien ist unterschiedlich, jedoch immer charakterisiert durch die maligne Umformung, Wucherung und Anhäufung hämato- und/oder lymphopoetischer Stamm- oder Vorläuferzellen im Knochenmark und in unterschiedlichem Ausmaß auch im Blut, in lymphatischen Geweben und anderen Organen {Scheinberg & Golde 1995}. Die Tumorzellen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) lassen sich durch morphologische, cytochemische und

immunologische Charakteristika der lymphatischen Zellreihe zuordnen {Löffler, 1975} {EGIL, Bene, et al. 1995}.

1.2 Unterteilung der ALL

1.2.1 zellmorphologische Einteilung der ALL (FAB Klassifikation)

Durch lichtmikroskopische Untersuchung lassen sich die Zellgröße, Kern-Plasma-Relation sowie Größe und Form der Nukleoli von ALL-Blasten bestimmen. Diese Charakteristika wurden 1976 durch eine internationale Arbeitsgruppe benutzt, um ALL-Zellen in drei Gruppen einzuteilen, die sogenannte FAB (**F**rench-**A**merican-**B**ritish)-Klassifikation {Bennett et al. 1976}. Über die morphologischen Gemeinsamkeiten hinaus gibt es innerhalb der FAB-Gruppen weitere Übereinstimmungen wie Altersverteilung, Progredienz der Erkrankung und Prognose {Catovsky et al. 1991} (Abbildung 1.1). Klinisch bedeutsam ist besonders die Identifikation des L3-(Burkitt)-Subtyps, da diese Erkrankung einem spezifischen Therapieprotokoll zugeführt wird {Westbrook 1997}.

Abbildung 1. 1: FAB-Klassifikation: modifizierte Übersicht nach Bennett et al. 1976

FAB-Subtypen	Bevorzugtes Alter	Häufigkeit	Morphologie
L1	Kindheit	Ca. 75%	<ul style="list-style-type: none"> ▶ homogene Zellpopulation, ▶ vorwiegend kleine Zellen ▶ meist regelmäßiger Zellkern ▶ fehlende oder kleine Nukleolen
L2	Erwachsenenalter	Ca. 20%	<ul style="list-style-type: none"> ▶ heterogene Zellpopulation ▶ oft große Zellen ▶ häufig Kernkerbung ▶ eine oder mehrere, oft große Nukleolen
L3 („Burkitt Typ“)	Kein bestimmtes Alter	Ca. 5%	<ul style="list-style-type: none"> ▶ homogene Zellpopulation ▶ große Zellen (Blasten) ▶ regelmäßiger Zellkern ▶ eine oder mehrere, prominente Nukleolen

1.2.2 Zytochemische Einteilung der ALL

Der Nachweis von bestimmten Enzymen bzw. chemischen Reaktionen hilft in Kombination mit der Begutachtung der Zellmorphologie (s.o.) bei der Differenzierung zwischen den akuten Leukämien. Die für die ALL typischen Nachweise sind in der Abbildung 1.2 aufgeführt. Von einer akuten undifferenzierten Leukämie (AUL) spricht man, wenn zusätzlich zur Myeloperoxidase und α -Naphthyl-Acetat-Esterase auch die fokale saure Phosphatase- und die PAS-Reaktion negativ sind {Löffler 1975}.

Abbildung 1.2: zytochemische Einteilung der ALL

Fokal saure Phosphatase-Reaktion:	bei ALL positiv
PAS-Reaktion:	bei ALL positiv
Myeloperoxidase:	bei ALL negativ
α -Naphthyl-Acetat-Esterase:	bei ALL negativ

1.2.3 Immunologische Einteilung der ALL (EGIL-Klassifikation)

Im Lauf ihrer Reifung präsentieren normale Lymphozyten unterschiedliche Antigene auf ihrer Oberfläche bzw. in ihrem Zellinneren. Durch den Nachweis dieser Antigene auf oder in den Leukämiezellen eines Patienten läßt sich der maligne Klon der B- oder T-Zellreihe sowie einem Reifungszustand zuordnen {Foon & Todd 1986} {Greaves 1989}. Bei der adulten ALL finden sich ca. 30% T-Linien- und 60% B-Linien-Zugehörigkeit. 10% der Zellen lassen sich zu keiner der beiden Zelllinien zuordnen {Westbrook 1997}. Philadelphia-Chromosom positive Leukämiezellen gehören nahezu immer zu den B-Lymphozyten {Linker 1997}.

Die genaue Einteilung erfolgt anhand des Antigenmusters, das in der CD (cluster groups of differentiation)-Nomenklatur beschrieben wird {Pallesen & Plesner 1987} {Knapp et al. 1989} {Erber 1990}. Für Europa hat die „European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)“ 1995 eine aktualisierte Klassifikation vorgeschlagen {EGIL, Bene, et al. 1995}. In Abbildung 1.3 sind die typischen, je nach Reifungsstufe unterschiedlichen Antigene der B-Zellreihe mit den dazugehörigen Immunophänotypen nach der EGIL-Klassifikation aufgeführt.

Abbildung 1.3: Immunophänotypen der B-Zellreihe, modifiziert nach der EGIL-Klassifikation
{EGIL, Bene, et al. 1995}

<u>B-ALL</u>					<u>T-ALL</u>			
	pro-B	common	prä-B	B	pro-T	prä-T	kortikale	reife
Progenitorzellantigene								
Tdt	+	+	+	-	+	+	+	+/-
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-	-
CD10	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
B-Zellantigene								
CD19	+	+	+	+	-	-	-	-
CD22(cy)	+	+	+	+	-	-	-	-
CD79	+	+	+	+	-	-	-	-
cyIgM	-	-	+	-	-	-	-	-
sIgM	-	-	-	+	-	-	-	-
T-Zellantigene								
CyCD3	-	-	-	-	+	+	+/-	-
CD7	-	-	-	-	+	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	-	+	-
mCD3	-	-	-	-	-	-	+/-	+

1.2.4 Zytogenetische Einteilung der ALL

Metaphasechromosomen können nach Anfärbung mittels des Lichtmikroskopes analysiert werden. Strukturelle oder numerische Abweichungen der Chromosomen von der Norm (Aberrationen) sind bei der ALL häufig. Unabhängig von allen anderen Einteilungskriterien besitzen einige Chromosomenaberrationen prognostische Signifikanz. Hierzu gehört an erster Stelle das Philadelphia-Chromosom, das aus einer Translokation zwischen dem langen Arm eines Chromosoms 9 und dem langen Arm eines Chromosoms 22 hervorgeht. Bei der ALL der Erwachsenen ist dies zugleich auch die häufigste Veränderung (s.Kap.1.6) {Secker-Walker et al. 1978} {GFCH 1996} {Rieder et al. 1996} {Faderl et al. 1998}. Die Identifikation von prognostisch ungünstigen Aberrationen hat therapeutische Konsequenzen, da in diesen Fällen intensivere Therapieregime, z.T. mit Knochenmarktransplantation durchgeführt werden müssen, um die Heilungschance zu bessern {Copelan & McGuire 1995} {Linker 1997}

{Wetzler et al. 1999}. Da die intensivierten Behandlungskonzepte eine erhöhte therapiebedingte Morbidität und Mortalität verursachen, müssen Patienten mit normalem Risiko hiervon ausgeschlossen werden, da hier der Nutzen die Gefahren nicht aufwiegt {Fraser et al. 1985}.

1.2.5 Einteilung nach dem Erkrankungsalter

Lediglich ca. 15% aller akuten lymphatischen Leukämien fallen in das Erwachsenenalter. Die erkrankten Erwachsenen unterscheiden sich von den Kindern hinsichtlich der FAB-Klassifikation der Leukämiezellen, der Immunologie sowie der Prognose und der Therapie {Mauer 1993} {Chessells et al. 1998}.

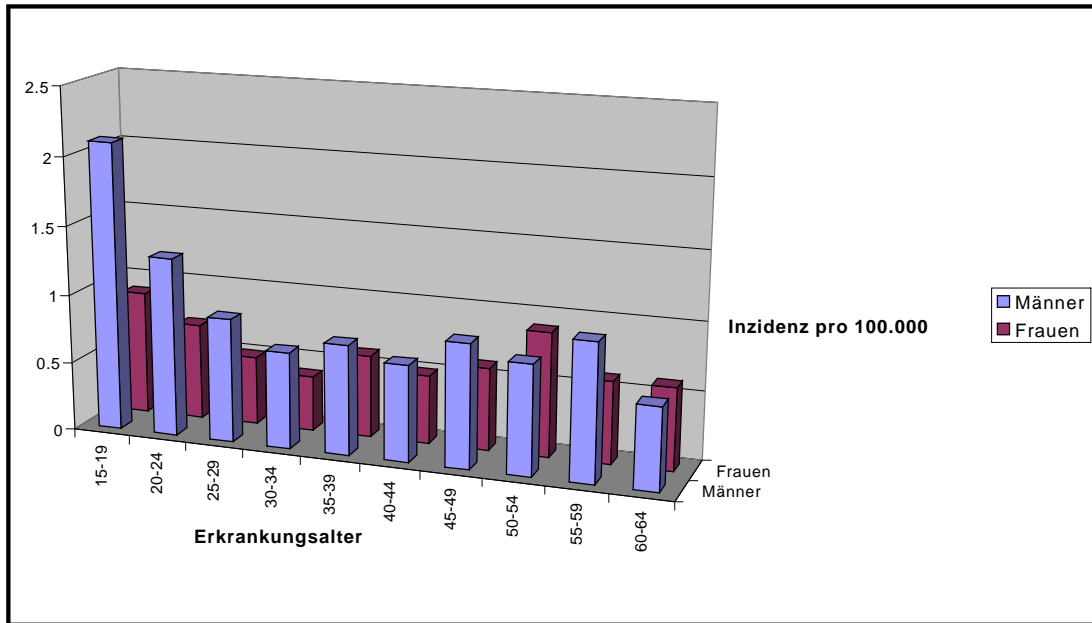
Erwachsene weisen zudem deutlich häufiger chromosomale Aberrationen mit ungünstiger Prognose als Kinder auf. So findet sich das Philadelphia-Chromosom bei 25-30% der Erwachsenen, jedoch nur bei 3-5% der Kinder {Perentesis 1997}. Die prognostisch günstigen Hyperdiploidien (>50 Chromosomen) hingegen lassen sich bei adulten Patienten in 17%, bei Kindern in 30% der Fälle nachweisen {Rieder et al. 1996} {Perentesis 1997}.

1.3 Inzidenz und Epidemiologie der akuten lymphatischen Leukämie

Die Inzidenz der ALL ist altersabhängig unterschiedlich. Sie hat ein erstes Maximum im Alter von 2-5 Jahren mit 4/100000 und fällt dann zum mittleren Lebensalter auf unter 1/100000 ab. Jenseits des sechzigsten Lebensjahrs steigt sie dann wieder an {Taylor et al. 1992} {Hoelzer 1993}. 80% der akuten Leukämien im Kindesalter sind lymphatische Leukämien. Sie stellen die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter dar. 85% aller Patienten mit ALL sind Kinder, entsprechend 15% Erwachsene {Lathan et al. 1994} {Scheinberg et al. 1995} {Perentesis 1997}.

Insbesondere die kindlichen ALL-Fälle zeigen eine bislang unerklärte Häufung in den industrialisierten Staaten, die vor 1930 noch nicht bestand {Greaves et al. 1993} {Ross et al. 1994}. Die Abbildung 1.5 stellt die Inzidenzen der ALL in Deutschland für 15- bis 65-jährige dar.

Abbildung 1.5: Inzidenz der ALL in Deutschland, modifiziert nach Messerer {Messerer 2001}



1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der akuten Leukämien ist in den meisten Fällen unbekannt. Für die myeloischen Leukämien gibt es einige gesicherte Risikofaktoren, wie Knochenmarkschädigungen durch ionisierende Strahlen (Hiroshima, Nagasaki, Tschernobyl, Therapie des M.Hodgkin) und chemische Substanzen (Benzol, Zytostatika), genetische Faktoren (Down-, Klinefelter-, Fanconi-, Wiskott-Aldrich Syndrom) und ein vorbestehendes myelodysplastisches Syndrom bzw. eine Polycythaemia vera {Nowell 1990}. Für die akute lymphatische Leukämie gibt es bislang keine ähnlich gut gesicherte Datenlage.

Infektionserkrankungen durch andere Viren mit möglicherweise langjährigem subklinischem Verlauf und Umweltbelastungen durch Radon wurden in Studien als mögliche Auslöser von kindlichen akuten lymphatischen Leukämien untersucht {Greaves, 1993} {Perentesis 1997}. Bislang fehlen jedoch noch größere Studien mit eindeutigen Ergebnissen.

Die Pathogenese der einzelnen Unterformen der ALL ist nicht einheitlich. Moderne zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungsmöglichkeiten haben

verschiedene Pathomechanismen aufgedeckt, die allein oder mit anderen die Entstehung des malignen Klons erklären können.

Die Philadelphia-Translokation, der Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. p16, T-Zell-Rezeptorgen- und Immunglobulingenmutationen stehen im Verdacht, Leukämien auslösen bzw. zu einer Progression der Erkrankung zu führen. Die Abgrenzung von anderen konsekutiv auftretenden Mutationen ist zumeist nicht einfach und erschwert die Identifikation eines einzelnen Mechanismus. Vermutlich sind mehrere Mechanismen notwendig, um eine Leukämie entstehen zu lassen {Shannon 1992 183 /id} {Sherr 1996} {Vogelstein & Kinzler 1998}.

1.5 Klinisches Erscheinungsbild der akuten lymphatischen Leukämien

Das klinische Erscheinungsbild der akuten Leukämien ist geprägt durch die Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark. Die daraus resultierende Verminderung der weißen Blutkörperchen (Leukopenie), der Blutplättchen (Thrombozytopenie) und der roten Blutkörperchen (Anämie) führt zu den typischen Symptomen: erhöhte Infektanfälligkeit, vermehrte Blutungsbereitschaft und allgemeine Schwäche, Blässe und Müdigkeit {Lathan et al. 1994 }.

Das Maß der Organbeteiligung ist unterschiedlich, aber grundsätzlich geringer als bei den chronischen Leukämien. In 50% der ALL-Fälle findet man einen Befall der Hirnhäute (Meningeosis leucaemica) {Masuhr & Neumann 1998}.

Darüber hinaus finden sich Lymphknotenschwellungen (30%), Milzvergrößerung und Leberbefall {Scheinberg & Golde 1995}.

1.6 Das Philadelphia-Chromosom

Alle Patienten meiner Studie gehören zu einer Subgruppe der ALL, deren Individuen dieselbe pathologische Chromosomenveränderung, das sogenannte Philadelphia-Chromosom, in ihrem Genom aufweisen.

Nowell und Hungerford gelang erstmals 1960 bei einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie der Nachweis eines stark verkürzten Chromosoms 22 {Nowell & Hungerford 1960}. Zehn Jahre später berichteten Propp und Lizzi von einem 53-jährigen Patienten mit ALL, der ebenfalls ein im gleichen Sinn verändertes Chromosom in seinen Knochenmarkszellen aufwies {Propp & Lizzi 1970}. Wie sich herausstellte, ließ sich dieses nach seinem Entdeckungsort benannte Chromosom, bei ca. 90% der Patienten mit CML, bei 1-2% der Patienten mit AML sowie bei ca. 5% der Kinder und bei ca. 30% der Erwachsenen mit akuter lymphatischer Leukämie („Ph+-ALL“) nachweisen. Da die Inzidenz der Ph+-ALL im Alter ansteigt, findet man bei den über sechzigjährigen Patienten ca. 50% Philadelphia-Chromosom positive im Gegensatz zu ca. 20-25% bei den unter sechzigjährigen erwachsenen Patienten. Bei Erwachsenen mit ALL stellt die t(9;22)-Translokation die häufigste strukturelle Chromosomenaberration überhaupt dar {Rowley 1990} {Perentesis 1997}.

Das Philadelphia-Chromosom entsteht in der Regel durch eine balancierte reziproke Translokation vom langen Arm des Chromsoms 9 auf den langen Arm des Chromsoms 22 (t(9;22)(q34;q11)). Bei einer solchen Mutation wird Erbsubstanz von zwei verschiedenen Chromosomen ausgetauscht, ohne daß es zu einem Verlust an DNA kommt.

In Abhängigkeit von der Stelle, an der sich der Translokationsbruch manifestiert, können unterschiedlich große chimäre Gene entstehen. Bei einem Bruch innerhalb der BCR (*breakpoint cluster region*)-Region des BCR-Gens (auch M-bcr Region genannt) kommt es zur Expressierung eines 210 kd großen Proteins. Dies ist der Fall bei nahezu allen CML-Patienten mit Philadelphia-Chromosom und bei ca. 50% der ALL-Patienten. Ein Bruch im ersten Intron des BCR-Gens (auch m-bcr Region genannt) bewirkt die Expressierung eines 190 kd großen Proteins, welches die andere Hälfte der Ph1 positiven ALL Patienten aufweist {Clark et al. 1987} {Kurzrock et al. 1988}.

Durch die Philadelphia-Translokation werden die Gene BCR von Chromosom 22 und das ABL-Gen von Chromosom 9 zu einem neuen chimären Gen verbunden. Das ABL-Gen ist ein Protoonkogen mit einer Homologie zu dem Abelson-Leukämievirus Onkogen und codiert für eine Tyrosinkinase. Tyrosinkinasen haben eine wichtige Rolle im Rahmen der zellulären Signalübertragung und Wachstumsstimulierung bzw. Wachstumskontrolle {Kantarijan et al. 1991} {Vogelstein & Kinzler 1998}. Viele der

sogenannten Onkogene entwickeln ihre Wirkung über Tyrosinkinasen. Die Wirkung des BCR-Gens im neuen BCR-ABL Gen besteht in der Blockierung der Wirkung inhibierender Faktoren mittels Bindung an regulatorische ABL-Abschnitte. Das Genprodukt des neuen BCR-ABL-Fusionsgen ist darum ebenfalls eine Tyrosinkinase, welche jedoch nicht mehr den normalen zellulären Kontrollmechanismen unterliegt {Pendergast et al. 1991} {Vogelstein & Kinzler 1998}. Dies läßt eine tumorinitiierende bzw. tumorfördernde Wirkung des Philadelphia-Chromosoms postulieren, was durch viele Studiendaten inzwischen bewiesen ist. Hierdurch ist auch verständlich, daß Philadelphia-Chromosom-positive Patienten eine deutliche schlechtere Prognose als Philadelphia-negative ALL-Patienten haben {Secker-Walker et al. 1978} {Westbrook et al. 1992}.

Um die Prognose dieser Hochrisikopatienten zu verbessern, müssen sie von Anfang an einem aggressiveren Therapieregime mit allogener Knochenmarktransplantation in der ersten Remission zugeführt werden {Hoelzer 1989} {Faderl 2003}.

Durch das Verständnis der oben angeführten molekularbiologischen Vorgänge konnten in den letzten Jahren Moleküle entwickelt werden, die der Therapie der Philadelphia-Chromosom-positiven Leukämien einen völlig neuen Ansatz geben. Pharmaka, wie z.B. STI-571, blockieren die Signalübertragung, die für die tumorfördernde Wirkung der BCR-ABL-Tyrosinkinase notwendig ist {Sattler & Griffin 2001}. Die ersten Studienergebnisse sind vielversprechend und eröffnen vermutlich ein neues Kapitel in der Tumorbekämpfung {Druker et al. 2001}.

1.7 Das Tumorsuppressorgen TP53

1.7.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Für die Entstehung von Tumoren haben, wie oben bereits erwähnt, zwei Gruppen von Genen herausragende Bedeutung: Onkogene und Tumorsuppressorgene.

Proto-Onkogene, d.h. Gene, die häufig eine physiologische Rolle im Rahmen des Zellwachstums einnehmen, können durch Mutationen (häufig Translokationen) in Onkogene umgewandelt werden. Diese veränderten Gene unterliegen oft nicht mehr der normalen Zellregulation, wodurch die davon betroffenen Zellen gegenüber normalen

Zellen einen Selektionsvorteil (häufig eine erhöhte Proliferationsrate) erhalten. Ein einziges mutiertes Allel reicht aus, um den Phänotyp der Zelle entsprechend zu verändern {Cline 1994}.

Andererseits kann auch durch den Ausfall von zellwachstum- und proliferationshemmenden Genen die Entstehung eines Tumors begünstigt werden. Nach der „Two-Hit Hypothese“ von Knudson müssen im Fall der wegen ihrer physiologischen Wirkung sogenannten Tumorsuppressorgene beide Allele durch Mutationen verändert sein, um das maligne Wachstum einer Zelle zu begünstigen (sog. „loss of heterozygosity“ oder „LOH“) {Knudson 1971} {Vogelstein et al. 1988}.

Zu den Tumorsuppressorgen zählt man auch die in dieser Studie bei erwachsenen Patienten mit ALL untersuchten Gene p16 und TP53.

1.7.2 Historie von TP53

1979 entdeckten Lane und Crawford, daß ein bislang unbekanntes Protein in Zellen, die mit dem bei Affen vorkommenden Simian-Virus-40 (SV40) infiziert waren, nachgewiesen werden konnte. Nach seiner Molekülgröße von 53 kD wurde es p53 genannt. Das Protein bildete Komplexe mit dem sogenannten „SV-40 large antigen“ {Lane & Crawford 1979}. Das in nachfolgenden Studien von Tumorzelllinien isolierte zugehörige Gen TP53 war in der Lage, Nagetierzellen maligne zu transformieren, wodurch TP53 in den Verdacht geriet, ein Onkogen zu sein {Eliyahu et al. 1985}.

Diese Vermutung wurde jedoch korrigiert, nachdem man festgestellt hatte, daß die Zelllinienversuche an bereits mutierten TP53-Genen vorgenommen worden waren. Die Begünstigung des Tumorwachstums war lediglich durch den Verlust der TP53-Wildtyp-Variante, einem klassischen Tumorsuppressorgen, entstanden {Eliyahu et al. 1988} {Michalowitz et al. 1990} {Hollstein et al. 1991} {Levine et al. 1991}.

Heute gilt TP53 als das Tumorsuppressorgen, das am häufigsten bei menschlichen Tumoren mutiert oder deletiert ist. Es scheint eine gewisse Spezifität der Art und Lokalisation der TP53-Mutation für bestimmte Tumoren zu geben. Besonders häufig findet man TP53-Mutationen bei Tumoren von Mamma, Bronchien, Schilddrüse, Colon, Gehirn, Blut und Ovarien {Hollstein et al. 1991}.

1.7.3 Charakteristika von TP53

Das TP53-Gen ist ein evolutionär hochkonserviertes Gen, d.h. es findet sich bei vielen Lebewesen in nur gering veränderter Form {Harlow et al. 1985} {Bienz-Tadmor et al. 1985}. Es ist beim Menschen in der Chromosomenbande 17p13 lokalisiert und kodiert für einen Transkriptionsfaktor {Fields & Jang 1990} {Raycroft et al. 1990}. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die sich an sogenannte Promotorregionen der DNA anlagern, um so das Ablesen bestimmter Gene und die damit verbundene Produktion von Proteinen zu verändern.

Das p53-Protein wird physiologischerweise vermehrt in Zellen exprimiert, deren DNA durch exogene Einflüsse (Strahlen, Chemikalien etc.) geschädigt ist. Es resultiert -p53 vermittelt- eine Arretierung dieser Zellen in der G1-Phase oder in dem G2/M Übergang des Zellzyklus, die es ermöglicht, Reparaturen an der DNA vorzunehmen. Ist die DNA zu stark geschädigt oder ist eine Reparatur aus anderen Gründen nicht möglich, wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet {Prokocimer & Rotter 1994}.

Die meisten TP53-Mutationen verhalten sich rezessiv, wie von Knudson und Mitarbeitern für Tumorsuppressorgene beschrieben. In der Regel muß es also zum Verlust der Heterozygotie (LOH) für TP53 kommen, bevor die betroffene Zelle maligne entarten kann. Einige Mutationen können jedoch durch Konformationsänderungen des exprimierten neuen Proteins zur verstärkten Komplexbildung mit dem Wildtyp(wt)-Protein neigen. Dies verringert oder verhindert die transkriptionelle Aktivierung anderer Gene durch das noch existierende wt-Allel und erscheint somit als dominant negative Mutation {Herskovitz 1987} {Harvey et al. 1995}. Auch andere Moleküle, wie das oben bereits erwähnte SV40-large-antigen und andere virale Proteine, können p53 binden und damit inaktivieren. Weiterhin kann ein mutiertes, nicht mehr funktionstüchtiges p53-Molekül um Bindungsstellen mit dem wt-Protein an den Promoterstellen der DNA kompetieren und das intakte Molekül verdrängen.

Inzwischen ist bekannt, daß das TP53-Gen und das p53-Protein in eine Vielzahl von weiteren Interaktionen mit anderen (Tumorsuppressor-)Genen und Molekülen involviert sind. Die differenzierte Erläuterung dieser hochkomplexen Zusammenhänge übersteigt den Rahmen dieser Darstellung.

Gesichert ist, daß es durch den Ausfall des p53-Proteins zu einer Anhäufung von DNA-Schäden kommt, die oft nicht behoben werden können, da die für die Zellarretierung,

Reparatur und Apoptose benötigten Proteine nicht mehr oder nicht ausreichend exprimiert werden. Hierdurch kann es zur Initiation oder Progression eines malignen Prozess kommen {Prokocimer & Rotter 1994 27 /id} {Rotter & Ronen 1997}.

1.7.4 TP53 bei Leukämien

Die häufigsten nachweisbaren genetischen Veränderungen bei Leukämien sind missense-Mutationen (d.h. Punktmutationen mit daraus resultierenden veränderten Aminosäuren im Endprotein) in CpG-reichen DNA-Sequenzen innerhalb des TP53-Gens {Hollstein et al. 1991}.

Nach der aktuellen Studienlage schwankt die Anzahl aller TP53 betreffenden Aberrationsarten je nach ALL-Subtyp zwischen 3-50%. Für ALL-Zellen, die morphologisch dem FAB L3-Subtyp zuzuordnen sind, wurde eine 50% Inzidenz von TP53-Mutationen nachgewiesen {Imamura et al. 1994}. T-ALL-Patienten zeigen am Anfang ihrer Erkrankung kaum TP53-Mutationen, wohingegen sich nach einem Rezidiv bei bis zu 30% der Patienten solche finden lassen. Bei Patienten mit der immunologischen Subklassifizierung pre-pre B-ALL, common-ALL und pre B-ALL konnten TP53-Aberrationen nur mit einer Häufigkeit von 3% nachgewiesen werden, wobei vor allem Patienten mit einem Rezidiv betroffen waren {Imamura et al. 1994}.

1.8 Das Tumorsuppressorgen p16

1983 entdeckten Kowalczyk et al., daß bei Kindern mit ALL des T-Zell-Subtyps häufig Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 bzw. komplette Chromosom 9-Verluste auftraten {Kowalczyk & Sandberg 1983}. Nachfolgende Untersucher konnten auch bei Erwachsenen und ALL-Patienten mit anderen Immunophänotypen sowie auch bei völlig anderen Tumoren Verluste der zwischenzeitlich genauer spezifizierten Chromosomenregion 9p21-22 nachweisen {Chilcote et al. 1985} {Carroll et al. 1987} {Lai et al. 1988} {Sessarego et al. 1991}. Anfänglich wurde vermutet, daß der sogenannte Typ1-Interferon-Gen-Cluster oder auch das Gen für die Methylthioadeninphosphorylase (MTAP), die beide auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 aufzufinden sind, bei den Deletionen regelmäßig verloren gehen und

damit als eventuelle Glieder in der Kausalkette der Tumorentstehung zu betrachten wären {Pollak & Hagemeyer 1987} {Olopade et al. 1992}.

1993 gelang dann Xiong et al. sowie Serrano et al. an Hefezellen der Nachweis eines Proteins, welches durch Bindung an eine sogenannte cyclinabhängige Kinase 4 den Zellzyklus beeinflusste {Xiong et al. 1993} {Serrano et al. 1993}. Es gehörte zu einer Reihe neuentdeckter, für den Zellzyklus bedeutender Moleküle, die cyclinabhängige-Kinase-Inhibitoren genannt wurden. Kurz darauf konnte durch Nobori et al. und Kamb et al. das in der Region 9p21 gesuchte Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden {Nobori et al. 1994} {Kamb et al. 1994}. Es codiert für das von Xiong und Serrano nachgewiesene Protein und wurde auf die Namen p16/INK4a/MTS1/CDK4I oder CDKN2A (offizielle HUGO Nomenklatur) getauft {Drexler 1998}. An dieser Stelle soll die weitverbreitete Schreibweise p16, welche Bezug auf das Molekulargewicht des Moleküls nimmt, beibehalten werden.

Inzwischen ist bekannt, daß ein weiteres Gen für einen cyclinabhängigen Kinaseinhibitor namens p15 (bzw. INK4b/MTS2/CDKN2B) in direkter Nachbarschaft zu p16 lokalisiert und häufig gemeinsam mit p16 deletiert ist. Sehr selten kommt es auch zu alleinigen p15-Deletionen. Weiterhin kann durch alternatives Spleißen des ersten von dreien für p16 codierenden Exons und einer folgenden Translation der drei Exone über ein alternatives Leseraster ein völlig anderes Molekül, welches p14^{ARF} (alternative reading frame) genannt wird, entstehen. Es ist kein cyclinabhängiger Kinaseinhibitor, greift aber dennoch über Beeinflussung des p53-Tumorsuppressorgen-Stoffwechselwegs hemmend in den Zellzyklus ein. Es gilt als Kandidat für ein weiteres eigenständiges Tumorsuppressorgen. Deletionen von p16 führen immer auch zu einer Deletion von p14^{ARF} {Ruas & Peters 1998} {Faderl et al. 1999}.

Die Abbildung 1.6 veranschaulicht die Lagebeziehungen und Genprodukte in der Region 9p21.

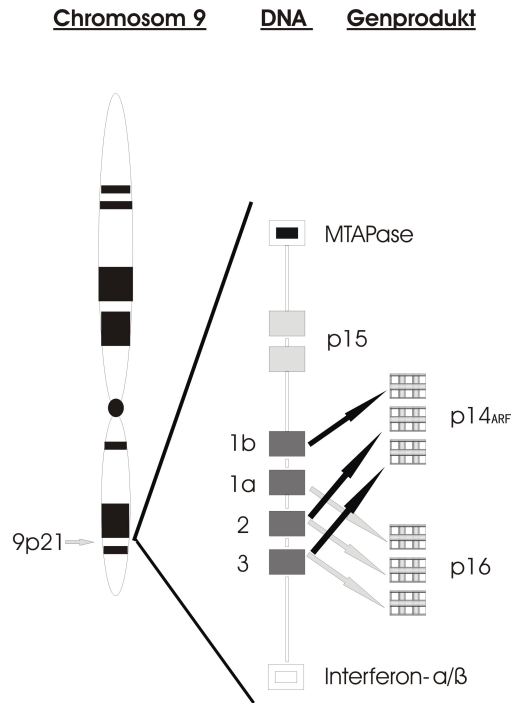


Abbildung 1.6:

Lagebeziehungen der Gene in der Region 9p21. Das erste der drei für p16 codierenden Exone kann in Exon 1a und Exon 1b aufgeteilt werden. Durch Spleissen an der entsprechenden Stelle entsteht durch Translation der Exone 1a-2-3 das p16-Molekül oder durch Exone 1b-2-3 p14^{ARF} (modifiziert nach Faderl et al. 1999).

1.8.1 Cycline, cyclinabhängige Kinasen und deren Inhibitoren

Cycline und cyclinabhängige Kinasen spielen eine wichtige Rolle im Zellzyklus von Eukaryoten. Durch den sich in Abhängigkeit vom Zellzyklus wiederholenden Anstieg und Abfall der Konzentration der Cycline (wodurch sie ihren Namen erhielten) werden die cyclinabhängigen Kinasen konzentrationsbedingt mehr oder weniger aktiviert. Ihre physiologische Wirkung besteht in der Phosphorylierung anderer Moleküle und Gene mit unterschiedlichen Wirkungen {Hunter 1993} {Marx 1994} {Hayette et al. 1997} {Serrano 1997}. Das Cyclin D1 z.B., führt mittels der cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4,CDK6) zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Retinoblastom-(Rb)-Tumorsuppressorgens. Als physiologischer Gegenspieler funktionieren die cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI), welche durch Bindung an Cyclinrezeptorstellen der cyclinabhängigen Kinasen dieselben kompetitiv hemmen. Im Fall des Cyclin D1 bzw. der Kinasen CDK4 und CDK6 bedeutet dies, daß es durch Anwesenheit der entsprechenden cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren nicht zu einer

Phosphorylierung und damit nicht zu einer Inaktivierung des Rb-Tumorsuppressorgens kommen kann {Hirama & Koeffler 1995} {Sherr 1996} {Ruas & Peters 1998}.

Mindestens vier cyclinabhängige Kinase-Inhibitoren, die ausschließlich an CDK4 und CDK6 binden, sind inzwischen bekannt: p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Darüber hinaus gibt es weitere Kinase-Inhibitoren, die mit den zahlreichen anderen Cyclinen und den dazugehörigen Kinasen interagieren.

p16^{INK4a} ist der bislang am besten untersuchte CDKI. Drei Hauptpathomechanismen, die zu seiner Inaktivierung bzw. seinem Fehlen führen, sind inzwischen bekannt. Diese Pathomechanismen weisen erstaunliche Präferenzen für bestimmte Tumortypen auf:

1. Homozygote Deletionen treten vor allem bei hämatopoetischen Erkrankungen, Gliomen und Blasenmalignomen auf.
2. Hypermethylierungen der Promoterregion finden sich u.a. bei Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen.
3. Missense- und Nonsensemutationen treten v.a. bei Karzinomen der Bauchspeicheldrüse, Gallenblase und Speiseröhre auf {Serrano 1997} {Ruas & Peters 1998}.

1.8.2 p16 bei Leukämien

Homozygote Deletionen sind der Hauptpathomechanismus der p16-Inaktivierung bei hämatopoetischen Erkrankungen und treten bei akuten lymphatischen Leukämien mit einer durchschnittlichen Frequenz von 21% auf. Intragenische Mutationen finden sich hier mit einer Frequenz von 0-7% {Ruas & Peters 1998}. Die einzelnen Unterformen der ALL unterscheiden sich hinsichtlich ihrer p16-Deletionshäufigkeit (0-58%).

Die zweithöchsten absoluten p16-Deletionsraten bei den Leukämien findet sich bei der lymphatischen Blastenkrise der CML (CML-BC). Hier werden sogar durchschnittliche Deletionsraten von 24%, in Einzelfällen auch bis 40%, beschrieben. Dies unterstreicht erneut die pathogenetischen Ähnlichkeiten der Ph-positiven ALL und der CML-BC.

Hingegen scheinen kaum Deletionen bei der AML, der CML in chronischer Phase, der CLL und dem myelodysplastischen Syndrom aufzutreten {Fazzoli et al. 1995} {Serra et al. 1995} {Ruas & Peters 1998}.

Bedeutende Unterschiede zwischen initialem p16-Deletionsstatus und Deletionshäufigkeit im Rezidiv wurden bei der ALL bislang nicht beobachtet. Auch konnten bis dato keine gravierenden Differenzen in der Häufigkeit von p16-Deletionen zwischen Kindern und Erwachsenen gefunden werden {Faderl, Kantarjian, et al. 1998}.

Mehrere Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen p16-Deletion und dem Vorhandensein von negativen prognostischen Faktoren bzw. einem schlechteren Outcome nachweisen. Diese Ergebnisse sind nicht unwidersprochen geblieben, wenngleich die Anzahl der Kritiker deutlich geringer ist als die der Befürworter dieses Zusammenhangs. {Haidar et al. 1995} {Ogawa et al. 1995} {Fizzoti et al. 1995} {GFCH 1996} {Rieder et al. 1996} {Dicciani et al. 1997} {Kees et al. 1997} {Ohnishi et al. 1997}.

Sherr sowie Stock et al. lieferten einen möglichen Erklärungsansatz, der darauf basiert, daß der Zellzyklus durch eine Vielzahl von Molekülen und Tumorsuppressorgenen reguliert wird. Es bestehen vielfältige Interaktionen dieser Gene und Moleküle. Dennoch lassen sich zwei Hauptwege des Zellzyklus differenzieren: ein hauptsächlich durch das Tumorsuppressorgen TP53 und ein zweiter durch das Retinoblastom-Gen und die cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren definierter Weg {Sherr 1996} {Stock et al. 2000}. Der Ausfall eines Regulationsmechanismus kann dieser Theorie nach zumeist noch ohne pathologische Folgen kompensiert werden. Wenn jedoch mehrere Schnittstellen betroffen sind, werden die Zellzyklus regulierenden Mechanismen insuffizient, und das Entstehen eines Tumors kann die Folge sein. Stock et al untersuchten nun erwachsene ALL-Patienten auf Deletionen und Mutationen der Tumorsuppressorgene TP53, RB und p16. Es zeigte sich, daß die Überlebensrate von Patienten mit 2-3 Genaberrationen signifikant von der mit 0-1 Aberration abwich (25 Monate Vs. 8 Monate) {Sherr 1996} {Stock et al. 2000}. Möglicherweise sind die oben angesprochenen Unterschiede in den Studienergebnissen zur Prognose von p16-Deletionen bei ALL ebenfalls mitbedingt durch zusätzlich vorhandene Mutationen anderer Tumorsuppressorgene.

1.9 Fragestellung

In der hier vorgelegten Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie häufig lassen sich mittels FISH bei erwachsenen Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver ALL homo- und hemizygote Verluste der Tumorsuppressorgene p16 und TP53 nachweisen ?
2. Wie häufig läßt sich bei Ph+-ALL-Patienten eine Isochromosom 17q Bildung nachweisen, und in welchem Verhältnis steht sie zum TP53-Status?
3. Welche zytogenetischen Besonderheiten weisen Patienten mit Verlust von p16 und/oder p53 auf und wie korrelieren diese mit dem FISH Befund ?
4. Welche Aussagekraft hat die FISH-Untersuchung bei p16- und TP53-Verlusten ?
Unterscheiden sich die in dieser Untersuchung mittels FISH erhobenen Befunde von Studien mit anderen Nachweisverfahren ?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Zur Herkunft der Patientenproben

Alle von mir aufgeführten Patienten wurden im Rahmen der Deutschen multizentrischen ALL/AUL-Therapiestudie der Erwachsenen (German Multicenter Therapy Trial in Adult ALL GMALL; Leiter: Prof. Dr. D. Hoelzer/Frankfurt) untersucht. Die klinische Verdachtsdiagnose ALL wurde durch die die Proben einsendenden Ärzte gestellt.

Die morphologischen, cytochemischen und immunologischen Befunde wurden im Rahmen der studienassoziierten zentralen Diagnostik erhoben. Für die Morphologie und Cytochemie war das Institut von Prof. Dr. H Löffler, PD Dr. Gaßmann in Kiel zuständig. Die immunologische Untersuchung wurde durch Prof. Dr. E. Thiel, PD Dr. Ludwig in Berlin durchgeführt.

Die tumorzytogenetische Untersuchung erfolgte für Patienten bis zum Jahre 1995 durch die Arbeitsgruppe Tumorzytogenetik (damalige Leiterin: Prof. Dr. Christa Fonatsch) am Institut für Humangenetik (Direktor: Prof. Dr. Eberhard Schwinger) der Medizinischen Universität zu Lübeck. Für die Einsendungen nach 1995 erfolgte die Untersuchung durch die Arbeitsgruppe Tumorzytogenetik (damaliger Leiter: PD Dr. Harald Rieder) der Abteilung für klinische Genetik (damalige Leiterin: Prof. Dr. Helga Rehder) am Medizinischen Zentrum für Humangenetik (Direktor: Prof. Dr. Grzeschik) der Philipps-Universität Marburg an der Lahn.

2.1.2 Alters- und Geschlechterverteilung

Das Datenmaterial meiner Studie stammt von 29 Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver akuter lymphatischer Leukämie. Die jüngste Patientin war 19, die älteste 73 Jahre alt. Der Median liegt bei 49 Jahren. Mit 18 Männern gegenüber 11 Frauen besteht ein deutliches Überwiegen der Männer bei der Geschlechterverteilung.

2.1.3 Klinisches Krankheitsstadium

Mit Ausnahme von einem Fall befanden sich alle von mir untersuchten Patienten im Stadium der Erstdiagnose. Ein Patient befand sich zum Untersuchungszeitpunkt im 1.Rezidiv.

2.1.4 Klassifikation der ALL der Studienpatienten

2.1.4.1 FAB-Klassifikation

Die FAB-Klassifizierung der Fälle war nur in Einzelfällen nachvollziehbar, weshalb eine morphologische Differenzierung der Leukämiezellen der Studienpatienten hier nicht erfolgt.

2.1.4.2 Cytochemische Klassifikation

Cytochemisch entsprachen alle Proben dem für die ALL klassischen Enzym- bzw. chemischen Reaktionsmuster: Myeloperoxidase und α -Naphthyl-Acetat-Esterase negativ, PAS-Reaktion positiv.

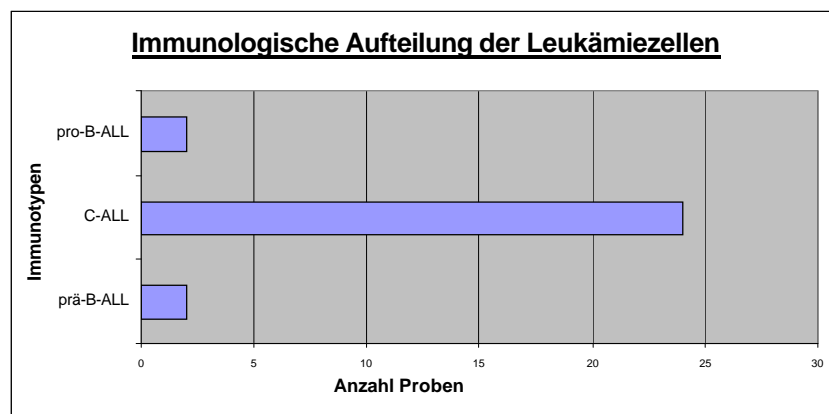
2.1.4.3 Cytogenetische Klassifikation

Bei allen von mir untersuchten Patienten war cytogenetisch und mittels BCR-ABL-Sonde die Philadelphia-Translokation nachzuweisen. Die einzelnen Karyotypen sind in Tabelle 7.2.1 im Anhang aufgeführt.

2.1.4.4 Immunologische Klassifikation

Alle untersuchten Patientenproben gehörten der B-Vorläufer-Zellreihe an. Innerhalb der B-Vorläufer-Zellreihe wurde nach der EGIL-Klassifikation eine Unterteilung in pro-B-, common(C)- und prä-B-ALL durchgeführt {EGIL, Bene, et al. 1995}. Von den 29 untersuchten Patienten liess sich bei 24 eine common ALL nachweisen. Ein Patient davon war zusätzlich für myeloische Antigene positiv. Weiterhin fanden sich jeweils zwei Patienten mit pro- bzw. prä-B-ALL.

Abbildung 2.1: Immunologische Aufteilung der Leukämiezellen



2.1.4.5 Molekularzytogenetische Klassifikation durch FISH

24 Patientenproben wurden sowohl auf das Vorhandensein des TP53- wie auch des p16-Gen untersucht. Bei zwei (TP53) bzw. drei (p16) weiteren Fällen wurde nur eines der beiden Gene untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Ergebnisteil detailliert aufgeführt.

2.2. Material

Die Patientenproben bestanden teils aus Blut, teils aus Knochenmarkaspirat und waren zur Antikoagulation mit Heparin in einer Konzentration von 10/100 i.E./ml Probe versetzt. Die Proben wurden von den einsendenden Kliniken per Kurier oder Eilpost steril in die oben genannten diagnostischen Zentren verbracht, so daß zwischen Probenabnahme und zytogenetischer Aufarbeitung maximal 24 Stunden lagen.

Besonders wichtig für die zytogenetische Diagnostik war, daß die ersten Proben vor Beginn einer chemotherapeutischen Behandlung abgenommen worden waren. Es wurden unterschiedliche Kultivierungsverfahren und Nährlösungen benutzt, die unter **2.4.2.1** genauer beschrieben werden sollen.

2.3 Geräte und verwendete Chemikalien

(siehe Auflistung im Anhang 7.1)

2.4 Methoden

2.4.1.1 Vorbemerkungen zur Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Die In-situ-hybridisierung ist ein Verfahren mit dem sich spezifische DNA- oder RNA-Sequenzen *in situ*, also direkt im biologischen Präparat nachweisen lassen.

Erste Erfolge mit diesem Verfahren hatten Pardue und Gall 1969 sowie John et al 1969, als sie mit radioaktiv markierten RNA-Sonden repetitive DNA in cytologischen Präparaten nachweisen konnten. 1981 gelang Harper und Saunders der erste Nachweis einer Einzelkopiesequenz, nämlich dem menschlichen Insulin Gen auf Chromosom 1. Durch die Entwicklung der In-situ-hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (FISH) konnte die Empfindlichkeit, Auflösung und Praktikabilität der Methode noch entscheidend verbessert werden {Trask 1991} {van Ommen et al. 1995}.

Einen besonderen Vorteil für die Untersuchung von Leukämien bietet FISH dadurch, daß, anders als bei der zytogenetischen Untersuchung, prinzipiell keine Metaphasepräparate für die Untersuchung notwendig sind. Diese lassen sich bei Leukämiepatienten oft nur schwer herstellen. Ein weiterer Vorteil gegenüber der konventionellen Zytogenetik ist die höhere Sensitivität für Chromosomenveränderungen {Mark et al. 1998}.

Gegenüber der PCR und dem Southern Blot hat die FISH einen Vorteil dadurch, daß ihre Sensitivität durch das Vorhandensein normaler, nichttumoröser Residualzellen weniger beeinflußt wird. Auch hemizygote Deletionen, die sowohl der PCR als auch dem Southern Blot entgehen, können mit der FISH oft nachgewiesen werden {Quesnel et al. 1996} {Drexler 1998}.

2.4.1.2 Prinzip und Ablauf der FISH

Für die Hybridisierung muß die Ziel-DNA (Gewebe, Blut) aufgearbeitet und denaturiert werden. Die Sonde, mit der die Ziel-DNA nachgewiesen werden soll, muß bei der nichtradioaktiven FISH durch Reportermoleküle wie Biotin oder Digoxigenin markiert und anschließend ebenfalls denaturiert werden. Sonde und Ziel-DNA werden dann zusammengefügt und für mehrere Stunden hybridisiert, d.h. beiden Nukleinsäuresequenzen wird Gelegenheit gegeben einander zu finden und miteinander die für einen Doppelstrang typischen Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen. Nach dieser Zeit werden die nicht hybridisierten Sequenzen abgewaschen und es erfolgt die Sichtbarmachung der eingebauten Reportermoleküle mittels spezifischen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern (Detektion). Nun können die markierten Zielsequenzen mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

2.4.1.3 Empfindlichkeit der FISH

DNA-Abschnitte von wenigen 100 Kilobasenpaaren (Kbp) Länge lassen sich durch FISH auf Metaphasechromosomen nachweisen. Durch das weniger stark kondensierte Chromatin bei Interphasechromosomen läßt sich hier sogar eine Auflösung von unter 100 Kbp erreichen {Leitch et al. 1994}.

Dadurch können auch zytogenetisch nicht erkennbare Deletionen oder Translokationen nachgewiesen werden. Punktmutationen oder Mutationen, von denen nur sehr kurze Sequenzen betroffen sind, können mit FISH jedoch nicht nachgewiesen werden.

2.4.2 Aufarbeitung der Proben

Um die von den Patienten entnommenen Blut- und Knochenmarkproben tumorzytogenetisch und mittels In-situ-hybridisierung untersuchen zu können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein:

- Die Anzahl der Zellen muß hoch genug sein, um eine statistische Auswertung des FISH-Befundes zu gewährleisten
- Es müssen zum Zeitpunkt der Fixierung genügend vitale Zellen vorhanden sein; bereits pyknotische (absterbende) Zellen weisen schlechte Färbereigenschaften, insbesondere für die In-situ-hybridisierung auf
- Zum Feststellen des Karyotyps muß sich eine ausreichende Anzahl der Zellen in der Metaphase befinden, denn nur in der Metaphase lassen sich die einzelnen Chromosomen in einem kondensierten Zustand und somit voneinander gut unterscheidbar darstellen

Um diese Ziele zu erreichen, müssen die entnommenen Patientenproben schnellstmöglich dem untersuchenden Institut zugeführt und dort verarbeitet werden. Nach der Verarbeitung und Konservierung bei -80°C ist eine Lagerung über mehrere Jahre möglich.

2.4.2.1 Kulturmedien

Leukämiezellen verhalten sich hinsichtlich ihrer Kultivierbarkeit sehr unterschiedlich. Es ist von vorneherein nicht möglich, die Nährlösung und Kultivierungszeit zu bestimmen, die optimale Ergebnisse liefert. Zumeist sind kurze (<48 Stunden) Kultivierungszeiten am effektivsten. In seltenen Fällen kommt es jedoch erst bei den 72-Stundenkulturen zu optimalen Ergebnissen. Aus diesem Grund wurden bei allen Patientenproben grundsätzlich mehrere parallele Ansätze mit unterschiedlichen Nährlösungen und unterschiedlichen Kultivierungszeiten angelegt, um so für das jeweilige Untersuchungsgut die bestmöglichen Bedingungen zu schaffen.

Verwendet wurden folgende Kulturmedien der Firma Gibco: RPMI 1640 mit Glutamin (R), McCoy's 5A (M) und Nutrient Mixture Ham's F10 (H). Die Ergänzung zu Vollmedien erfolgte durch Zugabe von 20% foetalem Kälberserum (FKS).

Der Gefahr einer mikrobiellen Überwucherung infolge von Kontamination wurde durch den Zusatz von 100 i.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,2 µg/ml Amphotericin B begegnet. Die Nährlösungen R(RT) und M(MT) wurden durch

Thymidin in einer Konzentration von 3,9 ng/ml Vollmedium ergänzt. Jeweils 5ml der gebrauchsfertigen Nährlösung wurden sodann in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei -20°C eingelagert. Vor der Verwendung wurden die Medien zuerst bei niedriger Temperatur aufgetaut und sodann auf 37°C erwärmt.

2.4.2.2 Zellkultivierung

Zur Zellkultivierung wurden je nach Zellzahl in der Probe zwischen 0,1 und 0,5 ml des nativen, heparinisierten Knochenmarkaspirats bzw. des peripheren Venenbluts in die angewärmten Nährmedien gegeben. Die Inkubation erfolgte für die 24h-, 48h- und 72h-Kulturen bei 37°C in einem Wärmeschrank, für die 4h-Kultur bei gleicher Temperatur in einem Wasserbad.

2.4.2.3 Präparation der Metaphasechromosomen nach Kultivierung

Zwei Stunden vor dem Ende der Kultivierungszeit wurde den Kulturen mit den Nährlösungen R,M und H das Colchizinpräparat Colcemid[®] bis zu einer Endkonzentration von $0,2\mu\text{g/ml}$ Medium zugefügt. Die Medien RT und MT wurden bis zu einer Endkonzentration von $0,05\mu\text{g/ml}$ Medium mit Colcemid[®] versetzt. Nach dem Ende der Kultivierungszeit erfolgten ein Abzentrifugieren bei 1000 U/min für 10 min, ein Abpipettieren des Überstands sowie eine sorgfältige Resuspension der Zellen. Anschließend wurde unter ständigem Durchmischen tropfenweise 5-7ml hypotone $0,075\text{M}$ KCl-Lösung zupipettiert.

Nach 20 Minuten Einwirkungszeit bei Raumtemperatur wurde die Suspension 7 min bei 800 U/min zentrifugiert. Danach erfolgten erneut ein Abpipettieren des Überstands und eine vorsichtige Durchmischung der Zellen. Die Zellen wurden nun durch tropfenweise Zugabe von eisgekühltem Fixativ fixiert, wodurch auch unerwünschte Schlieren verschwanden. Dieses Verfahren mit Zentrifugieren, Abpipettieren des Überstands, Resuspension und Fixation wiederholte ich noch dreimal bei dann jedoch 1000 U/min und siebenminütiger Zentrifugation.

Nach der letzten Fixation sowie einem 15-minütigen Ruhen der Suspension und anschließendem Absaugen des Überstands wurden die Zellen nun auf eiskalte, entfettete und mit Aqua dest. benetzte Objektträger aufgetropft bzw. erneut mit Fixativ versehen und bei -20°C konserviert.

Um eine genügend große Zellzahl und eine optimale Spreitung der Chromosomen auf dem Objektträger zu gewährleisten, erfolgte vor der Durchführung der FISH eine Kontrolle des Präparats unter dem Phasenkontrastmikroskop

Anzumerken ist noch, daß für die Auszählung nach der In-situ-hybridisierung hauptsächlich Signale aus Zellen in der Interphase, also mit nichtkondensierten Chromosomen, benutzt wurden. Dennoch war es sinnvoll, einige Metaphasechromosomen in dem jeweiligen Präparat zu haben, da sich an ihnen der Signalstatus und die chromosomale Zuordnung besser photographisch dokumentieren liessen und eventuell auftretende Hintergrundsignale besser als solche identifiziert werden konnten.

2.4.3.1 Herkunft und Herstellung der Gensonde für p16

Zum Nachweis des p16-Gens auf Chromosom 9 verwendete ich die PAC-Klone p1-106.2 und p1-106.3 (B.Beverloo, Rotterdam). Beide Sequenzen beinhalten die als p15, p16 und p14^{ARF} bekannten menschlichen Gene, unterscheiden sich jedoch voneinander durch zusätzliche Kilobasenpaaren proximal (p1-106.2) oder distal (p1-106.3) dieser Gene {Kamb et al. 1994}. Zur Vermehrung der Sonde in einer Bakterienkultur wurde ein sogenanntes PAC (**P**1-abgeleitetes **A**rtifizielles **C**hromosom)-System verwandt, welches in der Lage ist, Sequenzen bis zu einer Länge von 122 kb zu replizieren. Es ist ein künstlich geschaffenes System, das sich Bestandteile und Eigenschaften von Bakterien und Bakteriophagen zunutze macht, um genetisches Material zu vervielfältigen. Es basiert auf dem sogenannten F-Faktor, welcher ein Plasmid von E.coli Bakterien darstellt, und dem Bakteriophagen P1 {Ioannou et al. 1994} {Strachan & Read 1996}.

2.4.3.2 Ansetzen der PAC-Kultur

Zu Beginn wurden 500 ml Nährmedium nach Luria Bertani (LB) mit 20 µl/ml des Antibiotikums Kanamycin (Kana) versetzt, wovon sodann 2 ml LB/Kana abgenommen und mit der erworbenen PAC Kolonie beimpft wurden. Durch ein in den Vektor (das PAC-System) eingebrachtes Kanamycin-Resistenzgen ist es auf diese Weise möglich, Kontaminationen durch unerwünschte kanamycinempfindliche Bakterien zu unterdrücken. Nur die gewünschte PAC-Kolonie kann sich in der Übernachtskultur vermehren. Am nächsten Morgen wurden 500 µl der Übernachtskultur für einen Glycerinstock mit 30% Glycerinlösung (250 µl) versetzt und eingefroren. Der Rest der Kultur wurde in einer 1L Kulturflasche mit 500 ml LB/Kanamycin-Medium bei 250 U/min und 37°C für 4 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden 500 µl 1M IPTG zur Induktion der Replikation hinzugegeben, erneut 4 Stunden geschüttelt und dann bei 8000 U/min (5000xg) 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet übernacht eingefroren.

2.4.3.3 PAC-DNA-Aufreinigung, adaptiert nach Qiagen-Plasmid-Maxiprep-Protokoll®

Da in dem hergestellten Pellet nicht nur die gewünschte Sondensequenz, sondern auch Bakterien- und Bakteriophagenbestandteile und chromosomale DNA vorhanden sind, muß vor dem weiteren Gebrauch eine Trennung der Sondensequenz von unerwünschten Bestandteilen erfolgen. Diese Auftrennung führte ich mit dem modifizierten Plasmid-Maxiprep-Protokoll und Materialien der Firma Qiagen durch.

Das aufgetaute Pellet wird zuerst in 20 ml P1-Puffer (mit 1mg RNase = 100 µg/ml) und dann in 20 ml P2-Puffer aufgenommen. Der erste Puffer (P1) dient der Resuspension sowie der Entfernung von vorhandener unerwünschter RNA durch die zugefügte RNase. Der zweite Puffer (P2) enthält NaOH-SDS und erfüllt zwei Funktionen:

1. das Natriumdodecylsulfat (SDS) löst die Phospholipid- und Proteinkomponenten der bakteriellen Zellmembran auf, wodurch der Zellinhalt freigesetzt wird.
2. die Natronlauge (NaOH) denaturiert die freigesetzten Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA.

Es erfolgten erneutes Mischen durch mehrmaliges Invertieren und maximal fünfminütiges Inkubieren bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit muß auf der einen Seite lang genug sein, um eine ausreichende Menge von Plasmid-DNA durch SDS freizusetzen, darf auf der anderen Seite nicht zu lange sein, damit die Plasmid-DNA nicht zu stark durch das NaOH denaturiert wird {Birnboim & Doly 1979}. Anschließend wird 20 ml gekühlter P3-Puffer hinzugegeben, erneut gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der P3-Puffer enthält saures Natriumacetat (pH: 5,5) wodurch die Denaturierung gestoppt wird. Der hohe Salzgehalt bewirkt zudem eine Präzipitation des SDS mit denaturierten Proteinen, zellwandgebundener chromosomaler DNA und zellulärem Debris. Die Plasmid-DNA kann durch ihre geringere Größe und aufgrund der fehlenden Zellwandbindung frei in Lösung bleiben und wieder renaturieren.

Es erfolgten erneutes Mischen und 30-minütiges Zentrifugieren bei 20.000xg. Der klare Überstand wird nun in ein neues Gefäß überführt und wiederum für 15 min bei 20.000xg zentrifugiert. Die Präzipitate setzen sich auf diese Weise als Sediment ab. Die Plasmid-DNA bleibt im Überstand. Da durch die Zentrifugation nur eine grobe Differenzierung zu erreichen ist, erfolgt eine weitere Aufreinigung mittels einer Anionenaustauscherharzsäule. Bevor die aufzutrennende Lösung auf die Harzsäule (Qiagen tip 500[®]) gegeben wird, muß diese mit 10ml QBT-Puffer äquilibriert werden. Nach dem Auslaufenlassen des Puffers wird der Überstand auf die Säule gegeben. Die Salzsäurekonzentration und der pH-Wert des nachfolgenden QC-Puffers bestimmen, ob und wieviel DNA aus dem Überstand an den Anionenaustauscher gebunden wird. Bei idealer Puffereinstellung wird lediglich die Plasmid-DNA selektiv gebunden. Ich verwendete 2 x 30 ml QC-Puffer zum Auswaschen der unerwünschten Moleküle. Anschließend erfolgte eine Auswaschung der Plasmid-DNA mit 15 ml auf 50°C erwärmten QF-Puffer. Das Eluat wurde in einem Gefäß aufgefangen, mit 10,5 ml Isopropanol vermischt und sofort bei 4°C und 15.000xg für 30 Minuten zentrifugiert. Dann erneutes Entfernen des Überstands und Waschen der gefällten DNA mit 2 ml 70% Ethanol. Zuletzt nochmals 10-minütiges Zentrifugieren bei 15.000xg bei 4°C. Nach Dekantieren des Überstands nahm ich das Pellet mit einer Pipette auf und löste es in einer geringen Menge Aqua ad injectabilia bei pH 8.0 auf. Hiernach konnte ich es für die Nick-Translation weiterverwenden.

2.4.4 Markierung der Sonde (Nick-Translation) und Hybridisierung

Die Nick-Translation ist ein Verfahren, das dem Herstellen einer sogenannten Gensonde dient. Gensonden sind markierte DNA-Moleküle mit bekannter Sequenz, die komplementär zu einem Gen sind, welches man nachweisen möchte.

Die Markierung der Sonde erfolgt über zwei Enzyme: die DNase I, eine Endonuklease, welche Einschnitte („nicks“) an zufälligen Stellen der beiden DNA-Stränge verursacht, und die DNA-Polymerase I (Kornberg Polymerase), welche neben einer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität auch eine 5'-3'-Polymerase-Aktivität aufweist. Beide Enzyme werden einem Ansatz zugefügt, der neben der zu markierenden DNA-Sequenz die Nukleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP und ein mit Biotin markiertes dUTP enthält. An den von der DNase I verursachten Strangbrüchen setzt die DNA-Polymerase I an und führt am 5'-Ende zu einer Abspaltung von DNA-Nukleotiden. Durch die 5'-3'-Polymerase-Aktivität des gleichen Enzyms werden nun die zugegebenen teilweise markierten Nukleotide eingebaut. Der Einschnitt („nick“) wird in 5'-3'-Richtung auf dem DNA-Strang verschoben (translatiert). Aus der ursprünglichen Sequenz entsteht eine mit biotinylierten Nukleotiden markierte Gensonde. Die von mir verwendeten Enzyme und Nukleotide entstammen einem Nick-Translation-Kit von Boehringer Mannheim und wurden leicht modifiziert nach den Herstellerangaben eingesetzt.

Die oben beschriebene Markierungsreaktion, die bei 14°C im Wasserbad durchgeführt wurde, mußte von mir nach 2 Stunden durch Erhitzen auf 75°C gestoppt werden, um die Anzahl der durch die DNase I eingeführten Strangbrüche nicht zu hoch werden zu lassen. Danach stabilisierte ich die DNA-Struktur durch Zugabe von 3,1µl LiCL und entfernte die nicht in die Sonde eingebauten Nukleotide durch Fällung der DNA aus der Sonde. Hierzu fügte ich 93µl eiskaltes Ethanol 100% zu. Um zu verhindern, daß in der Sonde vorkommende repetitive Nukleotidsequenzen mit repetitiven Sequenzen im Patienten-Genom außerhalb der p16-Sequenz hybridisierten, gab ich vor der Fällung 10µl COT 1 DNA (1mg/ml) und 1µl Herings-Sperm DNA (10mg/ml) zu dem Ansatz und inkubierte ihn über Nacht bei -20°C.

Am nächsten Morgen wurden der Ansatz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und durch dreimaliges Zentrifugieren, Dekantieren des Ethanolüberstands und erneutes Zufügen von Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet nach dem letzten Dekantieren fast

ganz getrocknet war, nahm ich es mit 10µl deionisiertem Formamid auf. Formamid ist ein Denaturierungsmittel, welches die Wasserstoffbrücken in einem Doppelstrang chemisch aufbricht. In der von mir zugefügten Dosis bewirkt es lediglich eine Schmelzpunkterniedrigung und erleichtert somit die später folgende thermische Denaturierung und nachfolgende Hybridisierung der Sonde. Nachdem die DNA und das Formamid mehrere Stunden auf einem „Rüttler“ gelöst worden war, erfolgte die Zugabe von 10µl „Mastermix“ (4xSSC, 20% Dextransulfat).

Nun wurde die Sonde für 10min auf 70°C denaturiert und anschließend für eine Stunde im 37°C-Wasserbad inkubiert. Während dieser Inkubationszeit erfolgte das Binden von unspezifischen repetitiven SONDENSEQUENZEN durch die beiden zugeführten hochrepetitiven Nukleinsäuren („Reannealing“).

Anschließend pipettierte ich die Sonde auf die in der Zwischenzeit mit der Patienten-DNA präparierten Objektträger (siehe 2.4.6), deckte die Proben mit Deckgläsern zu und verschloß den Rand mit Fixogum®, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C .

2.4.5 Vorbereitung der weiteren Sonden für die Hybridisierung

Außer der selbst hergestellten und indirekt markierten Gensonde für p16 verwandte ich direkt markierte Sonden der Firma Vysis für TP53, Centromer 9 und Centromer 17, sowie eine indirekt markierte Sonde der Firma Oncor für Centromer 9.

Die von mir gebrauchte Oncor-Centromersonde für Chromosom 9 wurde nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank auf 37°C erwärmt. Anschließend entnahm ich 1,5µl und mischte ihn in einen Cup in dem bereits die fertige p16 Gensonde, sowie Formamid, Mastermix, COT 1 und Herings Sperm DNA vorgelegt waren. Das weitere Verfahren entspricht dem bereits oben geschilderten für die p16-Sonde.

Die direkt markierten Vysis Sonden wurden nach Entnahme aus dem Tiefkühlschrank auf 37°C erwärmt, kurz anzentrifugiert und in einer Menge von 0,5µl pro Probe mit 2µl Aqua a.i. sowie 7µl von dem mitgelieferten Hybridisierungspuffer vermischt. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte 5-minütiges Denaturieren bei 75°C im Wasserbad. Anschließend Auftragen der Proben auf die vorbereiteten Objektträger und weiteres Verfahren wie bei der p16 Gensonde.

Nach den ersten Hybridisierungen zeigte sich daß mit der direkt markierten Vysis-Sonde für Centromer 9 im Vergleich mit der Oncor-Sonde eine noch bessere Signalmarkierung zu erreichen war, so daß ich nachfolgend ausschließlich mit der Vysis-Sonde hybridisierte.

2.4.6 Vorbereitung der Objektträger für die Hybridisierung

Nach der Entnahme aus dem -80°C -Kühlschrank, in welchem die Patientenproben nach der Aufarbeitung über mehrere Jahre lagerbar sind, zentrifugierte ich die Proben für 7min auf 900 U/min. Anschließend konnte der Überstand, der aus fixierendem Eisessig bestand, abgesaugt und die resuspendierte DNA aus ca. 10cm Höhe auf die zuvor mit 100% Ethanol entfetteten und eisgekühlten Objektträger aufgetropft werden. Vor der weiteren Bearbeitung kontrollierte ich die Qualität und Anzahl der aufgetropften Zellen mit dem Phasenkontrastmikroskop und ließ die Objektträger dann mehrere Stunden bis zu einem Tag bei Raumtemperatur trocknen.

Um zu verhindern, daß auch RNA-Moleküle mit der Sonde hybridisieren und ein bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung störendes Hintergrundsignal erzeugen, behandelte ich die aufgetropften Zellen mit 120 μl RNase. Die Objektträger wurden sodann mit einem Deckglas abgedeckt und in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 39°C auf der Wärmeplatte inkubiert. Um die RNase und RNA-Bruchstücke von den Präparaten zu entfernen, folgten bei Raumtemperatur zwei mehrminütige Waschschrte mit 2xSSC und dann bei 70°C ein 30-minütiges Stabilisieren der DNA in 2xSSC. Nachdem die Präparate im 2xSSC wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, schloß sich ein kurzes Waschen in 0,1xSSC an. Jetzt denaturierte ich die Patienten-DNA durch einminütiges Einwirkenlassen von 0,07% NaOH, stoppte die Denaturierung mit kurzen Bädern in 0,1xSSC und 2xSSC und entzog den Präparaten anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100%) das Wasser. Nach einer kurzen Phase des Trocknens waren die Präparate nun bereit für die Hybridisierung, die, wie im vorigen Kapitel beschrieben, erfolgte.

2.4.7 Detektion

Nach einer genügend langen Hybridisierungszeit von mindestens zwölf Stunden entfernte ich das Fixogum und die Deckgläser von den Objektträgern und wusch sie bei Raumtemperatur für 10min in 2xSSC, anschließend bei 74°C für 5min in 1xSSC und zuletzt wieder bei Raumtemperatur für 5min in 2xSSC/Triton. Durch diese Waschungen werden Sondenanteile, die nicht oder nur teilweise mit der Patienten-DNA hybridisieren konnten, entfernt, wodurch wiederum der Hintergrund in der Fluoreszenzmikroskopie reduziert wird.

Prinzipiell können auch Einzelstränge miteinander hybridisieren, die nur z.B. 60%-Homologie miteinander aufweisen. Durch die geringere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen, verglichen mit einer Hybridisierung mit 80%-Homologie, ist diese Hybrid-DNA jedoch weniger stabil. Durch eine stringendere Waschung kann die Hybridisierung aufgehoben werden. Faktoren, die die Stringenz einer Waschung bestimmen, sind die Temperatur, die Ionenstärke und die Konzentration helixdestabilisierender Moleküle (z.B. Formamid) {Leitch et al. 1994}.

Nach der Waschung habe ich zur weiteren Reduktion des Hintergrunds die Objektträger mit Blocklösung überschichtet, ein Deckglas aufgelegt und in der feuchten Kammer für eine halbe Stunde inkubiert. Die Blocklösung enthält eine konzentrierte Proteinelösung (BSA -Rinderserumalbumin, Fraktion V - Boehringer Mannheim), welche unspezifische Bindungsstellen der DNA blockieren und damit für die nun folgenden Markierungsmoleküle unzugänglich machen soll. Dann wurden die Deckgläser wieder entfernt und die überschüssige Blocklösung durch kurzes Schwenken in Waschpuffer abgewaschen.

Um die biotinylierten bzw. digoxigenierten Nukleotide der Sonden fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, folgten nun die Detektionsschritte mit den verschiedenen Antikörpern.

Avidin ist ein im Hühnereiweiß vorkommendes Glykoprotein, das eine sehr hohe Affinität zu Biotin hat. Gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC), wird es im ersten Markierungsschritt auf die mit der p16-Sonde hybridisierte Patienten-DNA pipettiert. Es folgt die halbstündige Markierung unter einem Deckglas

mit anschließender sechsminütiger Waschung in Waschpuffer. Hierbei werden nicht gebundene Avidin-Moleküle abgewaschen.

Im zweiten Schritt erfolgt nach der gleichen Methode die Zugabe von biotinylierten Anti-Avidin-Antikörpern. Da ein Avidin-Molekül bis zu vier Biotinmoleküle binden kann, entwickelt sich eine Signalkaskade, die zu einer enormen Verstärkung des ursprünglichen Signals führt. Danach erneute Waschung.

Im dritten Schritt werden nochmals FITC-konjugierte Avidin-Moleküle, die an den Biotinbereich des zweiten Antikörpers binden, zugefügt.

Nach der letzten Waschung erfolgt eine zweiminütige DAPI (4'-6-Diamidin-2-phenylindol)-Gegenfärbung der DNA, wodurch die Sondensignale besser kontrastiert werden.

Das gleiche Prinzip gilt für die bereits vom Hersteller mit Digoxigenin markierte Centromer-9-Sonde von Oncor. Statt FITC wurde hier der Fluoreszenzfarbstoff TEXAS-RED verwandt, welcher an folgende Komponenten der Signalkaskade gekoppelt wurde: Anti-Digoxigenin von der Maus, Antikörper gegen Maus aus der Ratte, Antikörper gegen Ratte vom Esel.

Die weiteren vom mir eingesetzten Sonden sind vom Hersteller (Vysis) direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt worden. Eine zusätzliche Markierung oder Signalverstärkung war hier nicht erforderlich.

Die fertig markierten Präparate wurden zuletzt mit einigen Tropfen Vectashield® benetzt, durch ein Deckglas bedeckt und vorsichtig in einem Trockenblock zusammengepreßt. Dann konnte ich die lichtempfindlichen Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop auswerten.

2.5 Visuelle Auswertung der Proben

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung erfolgte zuerst eine Durchsichtung des Präparats auf in der Metaphase befindliche Zellen, welche zur Überprüfung der Signalmarkierung und zur Einschätzung des Sondenbackgroundsignals dienlich waren.

Wenn eine ausreichend kräftige Signalmarkierung und ein lediglich geringes Hintergrundsignal gegeben waren, erfolgte eine quantitative Auswertung anhand der Interphase-Zellen. Zentromer- und Gensonden waren durch die unterschiedliche Fluoreszenzfarbmarkierung gut zu unterscheiden. Da in jedem Präparat neben den

Leukämiezellen auch eine unterschiedliche große Fraktion von gesunden Lymphozyten vorhanden war, ergab sich auch bei Patienten mit mutierten Zellen in der Auswertung ein Mischbild. Ausschlaggebend für die Bewertung „homozygot bzw. hemizygot deletiertes Gen“ war das Verhältnis von aberranten zu normalen Zellen beim einzelnen Patienten und das Verhältnis zu den gesunden Kontrollen. Zellen, in denen nur die beiden *Zentromersignale* nachweisbar waren, wiesen auf eine homozygote Deletion des betreffenden Tumorsuppressorgens hin. Konsekutiv sprach das Vorkommen von zwei Zentromersignalen und einem einzelnen Gensondensignal für eine hemizygot Deletion. Eine nichtmutierte Zelle mußte zwei Signale für die Zentromersonden und zwei Signale für die beiden Allele der Tumorsuppressorgene aufweisen. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurde jedes Präparat mündigend durchsucht, bis 200 Zellen mit je zwei und zwei Signalen gefunden worden waren. Zellen mit hiervon abweichender Signalgebung wurden gesondert notiert. In einigen wenigen Fällen konnten keine 200 normalen Signale gefunden werden, so dass nach hinreichend langer Suche und Dokumentation von mindestens 100 aberrierenden Zellen die Auswertung beendet wurde.

2.6 Methodik der statistischen Auswertung

Zur Bestimmung von Grenzwerten, jenseits derer es sich um pathologische Werte handelt, errechnete ich aus den einzelnen Signalgruppen der Kontrollen prozentuale Mittelwerte und Standardabweichungen. Der Mittelwert jeder Gruppe, addiert zu der dreifachen Standardabweichung, ergab den CutOff-Wert für die entsprechende Gruppe bei den Patientenproben. Erzielte Werte oberhalb der CutOff-Grenze wurden mit Ausnahme einiger, in der Diskussion gesondert gewürdigten Spezialfälle als Deletion gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen

Bei der Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung von ALL Zellen ist in der Auswertung nicht stets nur eine uniforme Zellgruppe zu beurteilen, sondern oft finden sich auch nicht erkrankte Zellen, die neben den Tumorzellen in jedem Blut- und Knochenmarkpräparat vorkommen. Weiterhin kommt es vor, daß sich während der Tumorigenese einige Zellen des malignen Klons weiter verändern (mutieren) und dann sowohl zytogenetisch als auch in der FISH von dem Ursprungsklon differenzierbar sind. Bei einigen der von mir untersuchten Patienten konnte bei der zytogenetischen Untersuchung mehr als nur ein Karyotyp gefunden werden (siehe Abbildung 7.2.1). Auch Deletionen von Tumorsuppressorgenen müssen, wie im folgenden zum Teil demonstriert, nicht in allen Tumorzellen eines Präparats aufzufinden sein.

Damit nicht jede kleinste Signalabweichung als Deletion gewertet wird, müssen zuvor Grenzwerte bestimmt werden. Die statistische Auswertung der untersuchten Proben und Kontrollen wurde, wie unter 2.6 beschrieben, nach Entwicklung des Mittelwerts der Kontrollen und der Standardabweichung durchgeführt. Die für jede Signalkombination erhobene CutOff-Grenze dient zur Trennung der Deletionen von abweichenden Normwerten.

In einigen Fällen kam es zu einem geringen Überschreiten der CutOff-Grenze, ohne dass sich auch durch Hinzunahme der zytogenetischen Befunde eine sinngebende Signalkombination ergab. Diese Befunde sind im Rahmen des Gesamthybridisierungsergebnisses zu sehen und wurden von mir nicht als Deletion bewertet. Die Befunde werden in der Diskussion detailliert besprochen.

3.2 Häufigkeit von p16-Aberationen bei Ph+-ALL

3.2.1 Homozygote Deletionen

Bei 7 (28%) von 25 Patienten liessen sich in der FISH homozygote Deletionen des p16-Gens nachweisen. Zytogenetisch konnte bei 3 von diesen 7 Patienten eine Veränderung an jeweils einem kurzen Arm von Chromosom 9 nachgewiesen werden. Die Deletionen an den anderen Armen und die vier verbleibenden homozygoten Deletionen ohne zytogenetisch nachweisbare 9p Veränderung sind folglich erst durch die FISH entdeckt worden.

3.2.2. Hemizygote Deletionen

Bei zwei Patienten (8%) konnte eine hemizygote p16-Deletion nachgewiesen werden. Einer dieser Patienten wies ein Isochromosom 9 mit zytogenetisch nachweisbarem Verlust von 9p auf. Insgesamt zeigten also 36% (n=9) der 25 untersuchten Ph+-ALL Patienten p16-Deletionen.

3.2.3 9p Aberrationen

Zytogenetisch nachweisbare 9p-Aberrationen konnten nach obiger Ausführung bei 4 Patienten, also bei 16% von allen untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

In der Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse der Signalauswertung der FISH zusammengefasst.

Abbildung 3.1: Signalauswertung aus FISH für p16

Pat.Nr.	p16	Summe	%	0/1	%	0/2	%	0/3	%	1/0	%	1/1	%	1/2	%	1/3	%	2/0
001/92	x	222	0	0	54	120	0	1	0	0	0	0	5	10	0	0	0	1
72/92	x	219	0	0	1	2	0	0	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0
227/92	n.u.																	
317/92	x	205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
352/92	x	177	1	1	56	100	0	0	1	1	0	0	8	14	1	1	0	0
472/92	x	255	0	0	2	6	0	0	0	0	2	5	78	200	0	0	0	0
566/92	x	226	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	5	12	0	0	0	0
109/93	x	233	0	0	2	4	0	0	0	0	1	2	3	7	0	0	0	0
132/93	x	224	0	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
155/93	x	261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
468/93	x	263	0	1	7	18	0	0	0	0	0	1	76	200	0	1	0	0
232/94	x	259	2	6	77	200	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0
617/94	x	273	4	11	76	207	1	4	0	0	0	1	6	17	0	0	0	0
187/96	x	220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188/96	x	286	0	0	49	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
216/96	x	274	0	0	0	0	0	0	0	0	3	7	5	15	0	0	4	10
244/96	x	237	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	0	1	0	0	3	6
250/96	x	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0
304/96	x	221	0	0	90	200	0	0	0	1	0	0	1	3	0	0	0	0
330/96	x	224	0	0	67	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
357/96	x	236	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	7	0	0	0	0
358/96	x	228	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	3	0	0	0	1
14/97	x	211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
61/97	x	244	0	1	0	0	0	0	0	0	3	8	3	7	0	0	0	1
169/97	n.u.																	
171/97	x	244	0	0	1	2	0	0	0	0	2	5	5	11	0	0	0	0
230/97	n.u.																	
27/98	x	238	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0
31/98	x	222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
231/98	x	172	0	0	23	40	11	19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
CutOff			0%		2%		0%		0%		4%		8%		1%		2%	

Erläuterungen:

Pat.Nr.: Identifikationsnummer für jeden Patientenfall

p16: x = untersucht n.u. = nicht untersucht

Summe: Summe aller gezählten Signalkombinationen bei einem Patientenfall

%: Prozentanteil der in der nachfolgenden Spalte aufgeführten Signalkombination an allen Signalen

x#x: Anzahl p16 # Anzahl der Zentromersignale

CutOff in %: Der aus den Kontrollen errechnete prozentuale CutOff-Wert zur Differenzierung einer Deletion

Feldmarkierungen: schwarz: homo- und hemizygoten Deletionen

grau: über dem CutOff-Wert liegende, jedoch nicht als Mutation gewertete Signalkombination

Abbildung 3.1 (Fortsetzung Signalauswertung p16):

Pat.Nr.	%	2/1	%	2/2	%	2/3	%	2/4	%	3/0	%	3/1	%	3/2	%	3/3	%	3/4
001/92	0	0	39	86	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0
72/92	1	2	91	200	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2	4	0	1
227/92																		
317/92	0	0	98	200	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
352/92	0	0	31	55	0	0	0	0	1	1	0	0	2	3	0	0	0	0
472/92	1	2	16	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
566/92	0	1	92	209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109/93	7	17	87	202	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132/93	1	3	89	200	3	6	0	0	0	0	0	0	4	8	0	1	0	0
155/93	2	5	77	200	2	4	0	0	1	2	0	0	11	29	5	12	0	0
468/93	0	1	16	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
232/94	0	0	18	46	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
617/94	1	2	11	29	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
187/96	0	0	91	200	0	0	0	0	0	0	0	0	7	16	0	0	0	0
188/96	0	0	49	140	0	1	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0
216/96	12	34	73	200	1	2	0	0	0	0	0	1	1	4	0	0	0	0
244/96	9	21	84	200	0	0	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	0
250/96	2	4	93	200	0	1	0	0	0	0	0	0	2	4	0	1	0	0
304/96	0	0	6	14	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
330/96	0	0	31	70	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
357/96	3	6	85	200	1	2	0	1	0	0	0	0	5	12	3	6	0	0
358/96	7	15	88	200	0	1	0	0	0	0	0	1	2	5	0	0	0	0
14/97	4	9	95	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61/97	3	8	84	204	1	2	0	0	1	2	0	1	2	5	0	0	1	2
169/97																		
171/97	6	15	82	200	0	1	0	0	0	1	0	1	3	8	0	0	0	0
230/97																		
27/98	1	2	84	200	0	0	0	0	0	0	0	0	11	27	0	0	0	0
31/98	0	1	90	200	3	6	0	0	0	0	0	0	5	10	0	1	0	0
231/98	0	0	58	100	0	0	1	1	0	0	0	0	3	5	3	6	0	0
CutOff	16%		99%		3%		1%		0%		2%		9%		1%		0%	

Abbildung 3.1 (Fortsetzung Signalauswertung p16):

Pat.Nr.	%	4/0	%	4/1	%	4/2	%	4/3
001/92	0	0	0	0	0	0	0	0
72/92	0	0	0	0	0	1	0	0
227/92								
317/92	0	0	0	0	0	0	0	1
352/92	0	0	0	0	1	1	0	0
472/92	0	0	0	0	0	0	0	0
566/92	0	0	0	0	0	1	0	0
109/93	0	0	0	0	0	0	0	0
132/93	0	0	0	0	0	1	0	0
155/93	1	2	0	0	2	4	0	0
468/93	0	0	0	0	0	0	0	0
232/94	0	0	0	0	0	0	0	0
617/94	0	0	0	0	0	0	0	0
187/96	0	0	0	0	2	4	0	0
188/96	0	0	0	0	0	0	0	0
216/96	0	0	0	1	0	0	0	0
244/96	0	0	0	0	0	0	0	0
250/96	0	0	0	0	0	0	0	0
304/96	0	1	0	0	0	0	0	0
330/96	0	0	0	0	0	1	0	0
357/96	0	0	0	0	0	0	0	0
358/96	0	0	0	0	0	0	0	0
14/97	0	0	0	0	0	0	0	0
61/97	0	0	0	0	1	3	0	0
169/97								
171/97	0	0	0	0	0	0	0	0
230/97								
27/98	0	0	0	0	2	4	0	1
31/98	0	0	0	0	0	0	2	4
231/98	0	0	0	0	0	0	0	0
CutOff	0%		0%		2%		1%	

Die Fälle mit nachgewiesenen Aberrationen sind in Abbildung 3.2 zusammengefaßt.

Abbildung 3.2: Karyotypen der Patienten mit deletiertem p16 – Veränderungen von 9p sind hervorgehoben

Fall Nr.	Karyotyp
Homozygote Deletionen	
01/92	47,XY,t(1;14;12;der(9)t(9;22)(q34;q11))(q23;q32;q13;p13)
352/92	48,XY,+X,+8,der(9)t(9;22)(q34;q11),ider(22)t(9;22)(q34;q11)
232/94	46,XY, ider(9)t(9;22) (q34;q11), der(22)t(9;22)(q34;q11)
617/94	46,XX,der(9)t(9;22)(q34;q11) del(9)(p11) ,der(22)t(9;22)(q34;q11)
188/96	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
304/96	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
330/96	47,XY,t(1;6)(p26;p12),t(9;22)(q34;q11), der(9)(t(3;9)(p2?1;p1?2) ,del(11)(q23), +der(22)t(9;22)
Hemizyote Deletionen	
472/92	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
468/93	46,XY, 2xder(9)t(8;9)(q11;p13) t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)

In der folgenden Abbildung 3.3 ist das typische mikroskopische Bild einer Fluoreszenz-In-situ-hybridisierung einer Patientenprobe mit unauffälligem p16-Genstatus und nur sehr geringen Hybridisierungsartefakten zu sehen. Besonders interessant ist hier die gleichzeitige Dokumentation von Metaphase- und Interphasezellen.

Abbildung 3.3: Metaphase – und Interphasezelle mit normalem Signal für die Zentromere von Chromosom 9(rot) und p16 (grün)

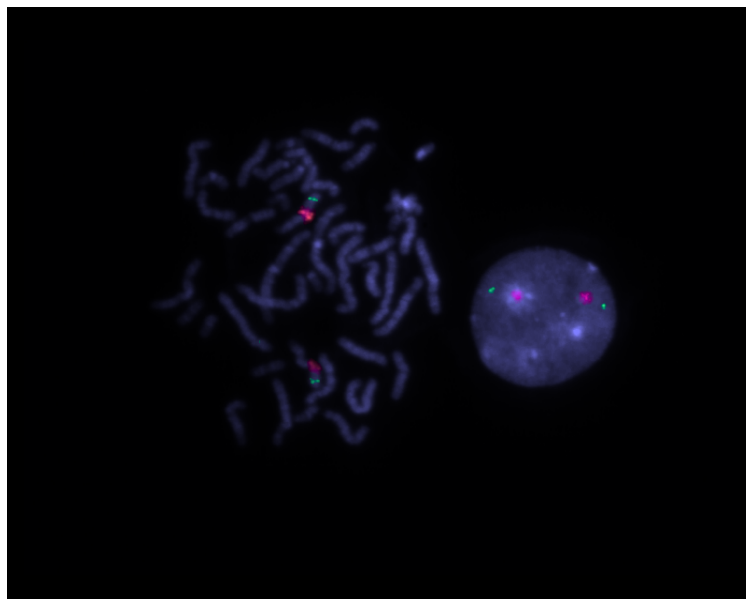
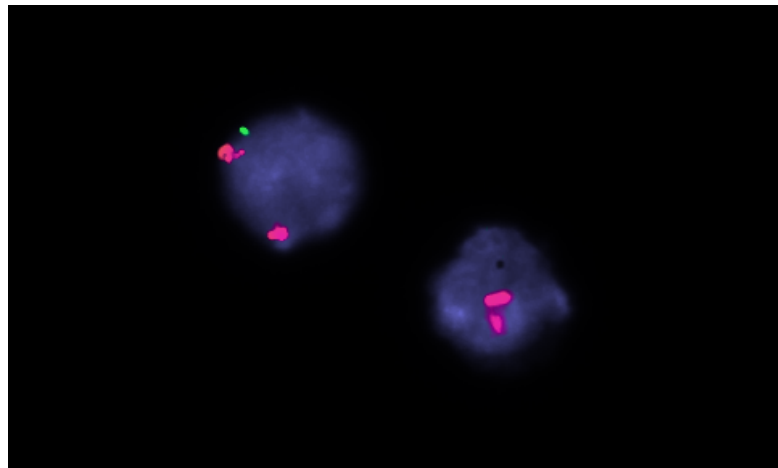


Abbildung 3.4 zeigt eine FISH-Signalkonstellation bei einem Patienten (617/94) mit dem Karyotyp 46,XX,der(9)t(9;22)(q34;q11)**del(9)(p11)**,der(22)t(9;22)(q34;q11). In der Auswertung fanden sich eine überwiegend homozygote Deletion (76%), jedoch auch ein geringer Prozentsatz von Zellen mit hemizygoter Deletion (6%). Auf diesem Bild sind rechts unten eine Zelle mit homozygoter und links oben eine Zelle mit hemizygoter Deletion parallel festgehalten.

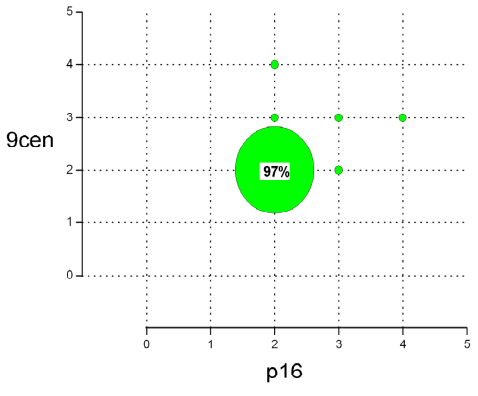
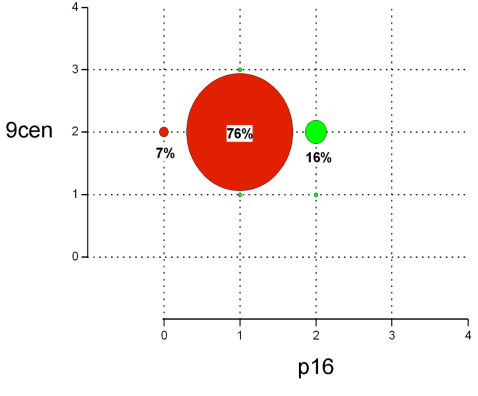
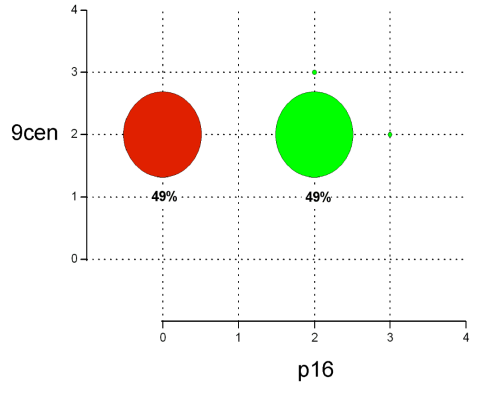
Abbildung 3.4: homo-/hemizygoter Deletion von p16 – Karyotyp :



Dies veranschaulicht, dass in einer Patientenprobe mehrere bzgl. des p16-Status divergierende Zellgruppen vorkommen können. Die folgende Abbildung 3.5 zeigt das Spektrum der möglichen Ergebnisse der von mir untersuchten Patientenproben.

Die Anzahl der in einer Interphasezelle gefundenen p16-Signale (im Präparat grün markiert) wurde auf der x-Achse, die Anzahl der Zentromersignale (im Präparat rot markiert) auf der y-Achse festgehalten. Eine Zelle ohne Deletionen muß 2/2 Signale aufweisen. 1/2 Signale sprechen für eine hemizygoter, 0/2 Signale für eine homozygoter Deletion. Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der jeweils gefundenen Zellen.

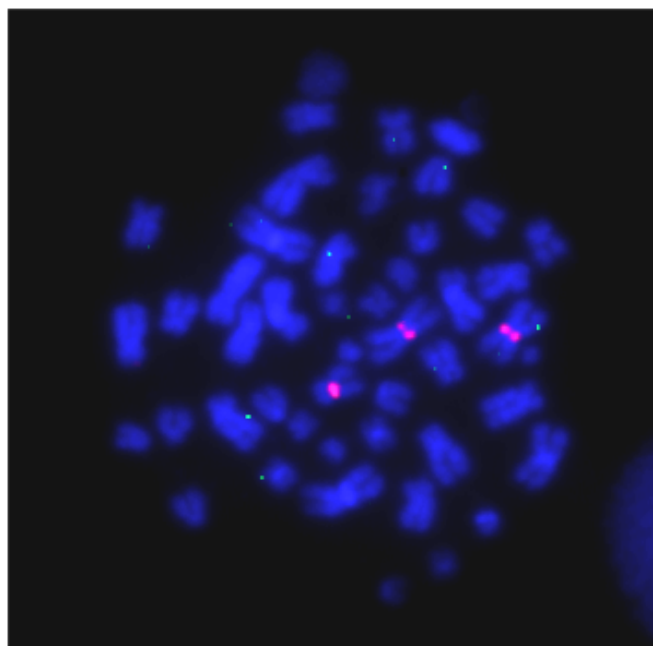
Abb. 3.5: Beispiele für typische Muster der Signalverteilung bei p16-Analysen; a) unauffällige Signalmusterverteilung. b) hemizygoter p16-Deletion, c) homozygoter p16-Deletion

Patient	Signalverteilung
<p>a.) Patient 317/92: 40 Jahre, männlich, Erstdiagnose, pro-B-ALL Karyotyp: 46,XY,dup(1)(q23q32),t(9;22)(q34;q11),del(16)(q11),i(17)(q10) Normalbefund: 97% aller Signale in Feld 2/2 (p16/Zentromer 9)</p> <p>x-Achse: Anzahl gezählter p16 Signale y-Achse: Anzahl gezählter Zentromersignale</p>	 <p>The plot shows a single large green bubble at the coordinate (2,2), representing 97% of the cells. The x-axis is labeled 'p16' and ranges from 0 to 5. The y-axis is labeled '9cen' and ranges from 0 to 5. There are several smaller green dots at other coordinates: (2,4), (2,3), (3,3), (4,3), and (3,2).</p>
<p>b.) Patient 468/93: 53 Jahre, männlich, Erstdiagnose, C-ALL Karyotyp: 46,XY,2xder(9)t(8;9)(q11;p13) t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22) hemizygoter Deletion: 76% aller Signale in Feld 1/2 (p16/Zentromer 9) 16% Signale in Feld 2/2 zeigen an, daß auch entweder Nichttumorzellen oder eine Subgruppe ohne hemizygoter Deletion in der Probe vorliegen.</p>	 <p>The plot shows two main populations. A large red bubble is at (1,2) labeled 76%. A smaller green bubble is at (2,2) labeled 16%. There are also small red dots at (0,2) and (2,1), and a small green dot at (2,0). The x-axis is labeled 'p16' and ranges from 0 to 4. The y-axis is labeled '9cen' and ranges from 0 to 4.</p>
<p>c.) Patient 188/96: 57 Jahre, männlich, Erstdiagnose, C-ALL Karyotyp: 46,XY,t(9;22)(q34;q11) homozygoter Deletion: 49% aller Signale in den Feldern 0/2 bzw. 2/2 (p16/Zentromer 9). Wiederum ein Hinweis auf das Vorliegen von Nichttumorzellen bzw. einer Subgruppe ohne Deletion.</p>	 <p>The plot shows two large populations. A red bubble is at (0,2) labeled 49%. A green bubble is at (2,2) labeled 49%. There are also small green dots at (2,3) and (3,2). The x-axis is labeled 'p16' and ranges from 0 to 4. The y-axis is labeled '9cen' and ranges from 0 to 4.</p>

3.2.4 Untersuchung eines Rezidivpatienten mit Ph+-ALL auf p16-Deletionen

Außer den oben aufgeführten Patienten mit der Erstdiagnose Ph+-ALL untersuchte ich noch einen weiteren Patienten, welcher sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits im ersten Rezidiv befand. Der Patient 231/98 mit dem Karyotyp 46,XY,2xder(9)t(8;9)(q11;p13) t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22) zeigte bereits in der zytogenetischen Untersuchung eine numerische wie strukturelle 9p-Aberration. In der FISH liessen sich damit übereinstimmend eine homozygote Deletion von p16 und eine partielle Trisomie 9 nachweisen. Durch die Verdoppelung des Derivatvchromosoms 9 zeigt sich in der In-situ-hybridisierung die in der Abbildung 3.3 dargestellte Signalkombination mit drei roten Zentromersignalen und einem durch die homozygote Deletion vollständig fehlenden grünen Signal für das p16-Gen. Die dennoch in der Abbildung sichtbaren diffus verteilten grünen Signale sind Hybridisierungsartefakte, welche durch ihre im Vergleich zu den Zentromersignalen scharfe Begrenzung und ihre diffuse Verteilung erkennbar sind. Sie entstehen durch unspezifisch gebundene fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sondenanteile, die bei der Waschung nur ungenügend entfernt werden konnten.

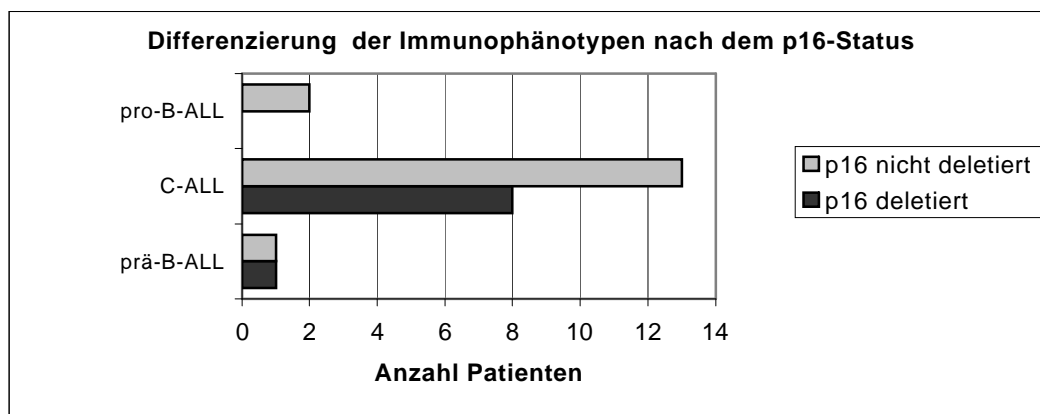
Abbildung 3.6: Verlust von p16 und Verdopplung von der(9)t(8;9)



3.2.5 Zusammenhang von p16-Deletionen mit dem Immunophänotyp

Von den neun Patienten mit hemi- oder homozygoten p16-Deletionen wiesen 8 (89%) eine common-ALL (C-ALL) auf. In der Gruppe ohne p16-Deletionen (n=16) fanden sich 12 (75%) C-ALL Fälle. In beiden Gruppen gab es je einen Patienten mit einer prä-B-ALL. In der Gruppe ohne p16-Deletion fanden sich darüber hinaus zwei Patienten mit einer pro-B ALL und einen Patienten mit einer Myeloid-Antigen positiven C-ALL. Abbildung 3.7 veranschaulicht die immunologische Aufteilung beider Gruppen.

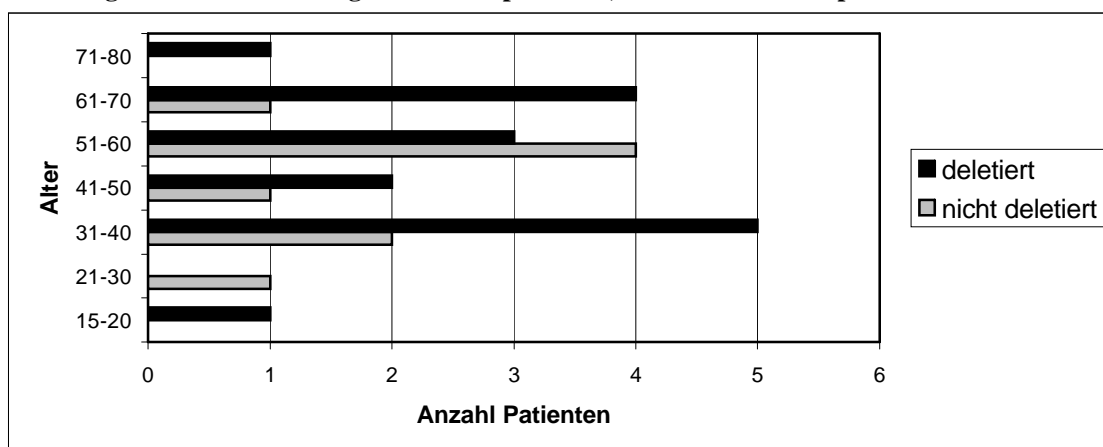
Abbildung 3.7: Differenzierung der Immunophänotypen nach dem p16-Status



3.2.6 Zusammenhang von p16-Deletionen mit dem Patientenalter

Die nach dem p16-Status differenzierte Altersverteilung der Studienpatienten weist unter Berücksichtigung der kleinen Fallzahl keine Besonderheiten auf (Abbildung 3.8).

Abbildung 3.8: Altersverteilung der Studienpatienten, differenziert nach p16 Status



3.3.1 Häufigkeit von TP53 Deletionen bei Ph+-ALL

Von 27 mittels FISH und konventioneller zytogenetischer Untersuchung auf TP53-Deletionen untersuchten Patientenproben konnte bei einem Patienten (317/92) eine hemizygote Deletion des TP53-Gens nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Häufigkeit von 3,7%. Ursache der Deletion war die Bildung eines Isochromsoms 17q, durch die ein kurzer Arm mitsamt der für TP53 codierenden Sequenz verloren ging:

46,XY,dup(1)(q23q32),t(9;22)(q34;q11),del(16)(q11),i(17)(q10).

Isolierte TP53-Deletionen ohne Isochromosom 17q oder ein weiteres Isochromosom 17q ohne TP53-Deletion liessen sich in den 27 untersuchten Proben nicht nachweisen.

3.3.2 Häufigkeit weiterer TP53-Aberrationen

Bei dem Patienten 357/96 mit Polyploidie und dem zytogenetischen Verdacht auf eine Trisomie 17 konnte diese mit der FISH bestätigt werden. Auffällig war bei diesem Patienten die große Anzahl von apoptotischen Zellen und die geringe Anzahl (36%) von bzgl. ihres TP53/Zentromer-Status normalen Zellen in der Präparation (sonst durchschnittlich 86%). So fanden sich in dieser Patientenprobe auch 16% Zellen mit drei Zentromer/zwei TP53-Signalen. Zu beachten sind hier die fortgeschrittene Zelldeneration und die damit eingeschränkte Aussagekraft. Das Präparat wurde aus der Auswertung herausgenommen.

In der Abbildung 3.10 sind die Karyotypen der beiden Fälle mit TP53-Veränderungen, sowie die zu ihnen korrelierende Signaldarstellung in der FISH mit Erläuterungen dazu aufgeführt.

Abbildung 3.9: Veränderungen des TP53-Status und korrespondierende Karyotypveränderung

Fall Nr.	Karyotyp
Hemizygote p53 Deletionen	
317/92	46,XY,dup(1)(q23q32),t(9;22)(q34;q11),del(16)(q11),i(17)(q10)
p53 Zugewinn durch Trisomie 17	
357/96	52,XX,+?4,t(9;22)(q34;q11),+?14,+?15,+?17,+?20,+der(22)t(9;22)

Die nachfolgende Abbildung 3.10 zeigt eine Zusammenschau der Auswertungsergebnisse für TP53.

Abbildung 3.10: Signalauswertung aus FISH für TP53

Pat.Nr.	TP53	Summe	%	0/1	%	0/2	%	0/3	%	1/1	%	1/2	%	1/3	%	2/0	%	1/2	%	2/2
001/92	x	215	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0	0	2	4	93	200
72/92	x	217	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6	1	2	0	0	0	1	93	202
227/92	x	232	0	0	0	0	0	0	1	2	3	6	0	0	1	2	4	9	86	200
317/92	x	280	0	0	0	0	0	0	1	4	3	8	0	0	0	0	24	66	71	200
352/92	x	235	0	0	0	1	0	0	1	3	6	15	0	0	0	0	4	9	86	201
472/92	x	231	0	0	0	0	0	0	0	1	10	23	0	0	0	0	3	7	87	200
566/92	x	206	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0	1	2	97	200
109/93	x	236	0	0	0	0	0	0	3	6	7	16	0	0	0	0	2	4	85	200
132/93	n.u.																			
155/93	x	229	0	0	0	0	0	0	0	1	7	16	0	0	0	0	3	7	87	200
468/93	x	225	0	0	0	0	0	0	2	4	6	13	0	0	0	0	1	2	89	200
232/94	x	227	0	0	0	0	0	0	0	1	5	12	0	0	0	0	3	6	88	200
617/94	x	235	0	0	0	0	0	0	3	8	6	15	0	0	0	0	3	6	85	200
187/96	x	219	0	0	0	0	0	0	0	1	3	7	0	0	0	0	5	10	91	200
188/96	n.u.																			
216/96	x	253	0	0	0	0	0	0	2	6	4	10	0	0	0	0	7	17	79	200
244/96	x	233	0	0	0	0	0	0	0	1	3	8	0	0	0	0	3	6	86	200
250/96	x	235	0	0	0	0	0	0	0	1	6	14	0	1	0	0	7	17	85	200
304/96	x	238	0	0	0	0	0	0	1	2	3	6	0	0	1	3	7	17	84	200
330/96	x	226	0	0	0	0	0	0	1	2	3	6	0	0	0	1	6	13	88	200
357/96	x	115	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3	3	0	0	1	1	36	41
358/96	x	225	0	0	0	0	0	0	0	0	4	8	0	0	0	0	2	5	92	206
14/97	x	221	0	0	0	0	0	0	1	3	2	5	0	0	0	0	5	11	90	200
61/97	x	234	0	0	0	0	0	0	1	2	4	10	0	0	0	0	4	10	85	200
169/97	x	214	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	1	93	200
171/97	x	232	0	0	0	0	0	1	1	2	5	12	0	0	0	0	1	3	86	200
230/97	x	212	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	94	200
27/98	x	227	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	5	88	200
31/98	x	216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	205
231/98	n.u.																			
CutOff			0%		0%		0%		4%		6%		1%		1%		9%		102%	

Erläuterungen:

Pat.Nr.: Identifikationsnummer für jeden Patientenfall

TP53: X = untersucht n.u. = nicht untersucht

Summe: Summe aller gezählten Signalkombinationen bei einem Patientenfall
Prozentanteil der in der nachfolgenden Spalte aufgeführten Signalkombination an allen

%: Signalen

x#x: Anzahl TP53 Signale # Anzahl der Zentromersignale

CutOff in %: der aus den Kontrollen errechnete prozentuale CutOff-Wert zur Differenzierung einer Deletion

Feldmarkierungen: schwarz: hemizygote Deletion bei 2#1

Trisomie 17 bei 3#2 und 3#3

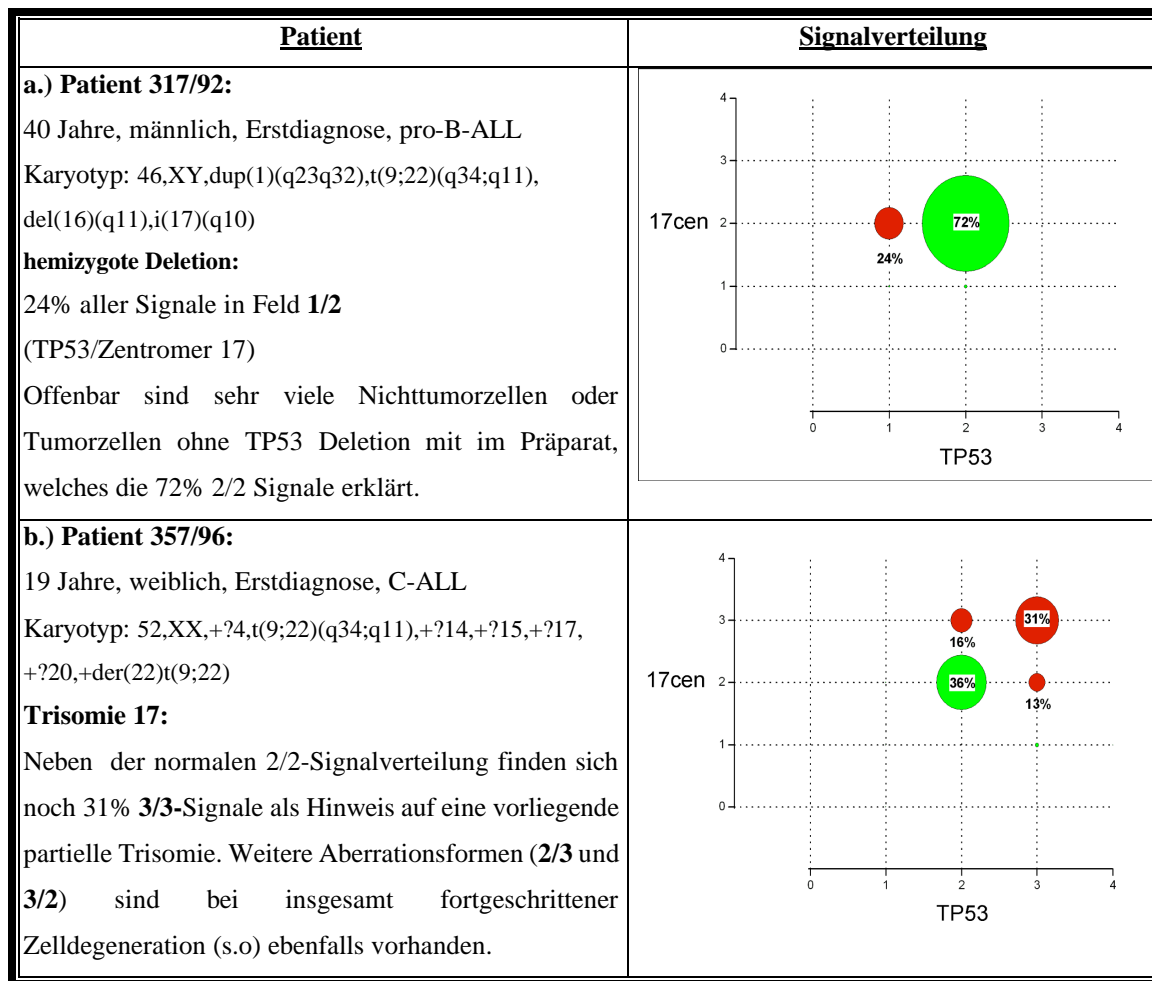
grau: über dem CutOff-Wert liegende, jedoch nicht als Mutation gewertete Signalkombination

Abbildung 3.10: (Fortsetzung Signalauswertung TP53)

Pat.Nr.	%	2/3	%	2/4	%	2/5	%	3/1	%	3/2	%	3/3	%	3/4	%	4/2	%	4/3
001/92	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
72/92	1	2	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
227/92	1	3	0	0	0	0	1	2	2	4	0	0	0	0	1	3	0	1
317/92	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
352/92	1	2	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
472/92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
566/92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109/93	1	2	0	0	0	0	0	0	3	8	0	0	0	0	0	0	0	0
132/93																		
155/93	1	2	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
468/93	0	1	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
232/94	1	2	0	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0
617/94	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	1	0	0	0	1	0	0
187/96	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188/96																		
216/96	3	8	0	1	0	0	0	1	2	6	2	4	0	0	0	0	0	0
244/96	3	6	0	0	0	0	0	0	2	4	3	7	0	1	0	0	0	0
250/96	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
304/96	0	0	0	0	0	0	1	2	3	8	0	0	0	0	0	0	0	0
330/96	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
357/96	12	14	1	1	0	0	0	0	16	18	30	35	0	0	0	0	0	0
358/96	1	2	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
14/97	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
61/97	1	3	0	1	0	0	0	0	3	6	1	2	0	0	0	0	0	0
169/97	1	2	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	1	0	1
171/97	0	1	0	0	0	0	0	0	5	11	0	1	0	0	0	1	0	0
230/97	1	3	0	0	0	0	0	0	2	4	0	1	0	0	0	0	0	0
27/98	6	13	0	0	0	0	0	0	3	6	0	1	0	0	0	0	0	0
31/98	0	1	0	1	0	0	0	0	4	9	0	0	0	0	0	0	0	0
231/98																		
CutOff	9%		2%		1%		2%		3%		2%		0%		0%		0%	

In Abbildung 3.11 sind exemplarische Proben der TP53 Auswertung graphisch dargestellt:

Abbildung 3.11: Signalverteilung bei Fällen mit abweichendem TP53-Signalmuster a) hemizygote Deletion durch i(17)(q10) in einer kleinen Zellpopulation, b) überzähliges Signal für das Zentromer von Chromosom 17 sowie für TP53 in 33% der Zellen bei Trisomie eines Chromosoms 17



3.3.2 Zusammenhang von TP53-Deletionen mit dem Immunphänotyp und dem Patientenalter

Aufgrund der geringen Aberrationsrate für TP53 liessen sich keine auffälligen Trends bzgl. Immunphänotyp oder Patientenalter und Gendeletion nachweisen. Der oben erwähnte Patient mit dem Isochromosom 17 war immunologisch an einer pro-B-ALL erkrankt und 40 Jahre alt. Die Patientin mit der Trisomie 17 war 19 Jahre alt und litt an einer immunologisch C-ALL klassifizierten Leukämie.

3.4 Divergierende Befunde in FISH und Zytogenetik und deren Bedeutung

Wie oben bereits berichtet, konnte bei einigen Patienten mit mittels FISH nachgewiesener p16- bzw. p53-Veränderung auch eine dazu entsprechende Veränderung in der zytogenetischen Untersuchung des Karyotyps nachgewiesen werden. Da die FISH, verglichen, mit der Zytogenetik eine höhere Sensitivität für kleinere Deletionen hat, ist es, wie beobachtet, möglich, daß sich Gendeletionen in der FISH finden lassen, welchen in der Zytogenetik jedes Korrelat fehlt.

Umgekehrt jedoch sollte ein Patient mit zytogenetisch nachweisbarer Deletion immer auch einen Verlust des im Deletionsbereich liegenden Gens in der FISH aufweisen, es sei denn, es handelt sich um eine Translokation oder komplexere Chromosomenaberration.

Bei einem der von mir untersuchten Patienten (155/93) ließ sich in der Tat trotz eines Karyotyps mit einem dizentrischen Chromosom 9 und Beteiligung der kurzen Arme (45,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)**dic(9;20)(p11;q11.1)**,der(22)t(9;22)(q34;q11)), der eine p16-Gendeletion erwarten ließ, keine Veränderung in der FISH nachweisen. Die möglichen Ursachen werden in Kapitel 4 diskutiert.

4. Diskussion

4.1.1 Häufigkeit von p16-Deletionen bei der Ph+-ALL des Erwachsenen

Die große Bedeutung von Mutationen des Tumorsuppressorgens p16 ist in den letzten Jahren für eine Vielzahl von Tumoren, insbesondere auch lymphatische Leukämien, beschrieben worden {Pollak & Hagemeijer 1987} {Quesnel et al. 1996} {Ragione & Iolascon 1997} {Drexler 1998} {Ruas & Peters 1998} {Faderl et al. 1999}. Erwachsene Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver ALL stellen eine Untergruppe der lymphatischen Leukämien mit besonders schlechter Prognose dar. Untersuchungen zur Bedeutung und Häufigkeit von p16-Verlusten innerhalb dieses Kollektivs sind rar und beschränken sich –wenn vorhanden- auf wenige Ph+-Fälle innerhalb einer ansonsten Ph-negativen ALL-Patientengruppe {Fizzoti et al. 1995} {Quesnel et al. 1995} {Hayette et al. 1997} {Faderl et al. 1999}.

Von den 25 von mir untersuchten Ph+-ALL Patientenproben wiesen 7 (28%) eine homozygote Deletion auf. Zwei weitere Patientenproben (8%) zeigten hemizygoten Deletionen, wovon eine auf ein Isochromosom 9 zurückzuführen war. In einer Studie von Faderl et al. konnten bei zehn erwachsenen Ph+-ALL-Patienten vier (40%) homozygote sowie eine (10%) hemizygoten Deletion nachgewiesen werden {Faderl et al. 1999}. Hayette et al. fanden mit 41% (n=7) homozygoten Deletionen in einer altersgemischten Gruppe von 17 Ph+-ALL-Patienten eine ähnlich hohe Aberrationsrate {Hayette et al. 1997}. Die Anzahl der homozygoten Deletionen in Studien mit bzgl. des Philadelphia-Chromosom-Status und Immunophänotyp gemischten ALL-Patientengruppen liegt zwischen 14% und 23%. In dem größten hierzu publizierten Review berichtet Drexler von 23% homo- und hemizygoten Deletionen bei 1037 Patienten {Drexler 1998}.

Die nachfolgende Abbildung 4.1 faßt die verschiedenen Studienergebnisse zusammen und veranschaulicht Gemeinsamkeiten und Differenzen meiner Ergebnisse, veröffentlicht unter *Rieder et al.*, mit denen von anderen Autoren.

Abbildung 4.1: Studienergebnisse zu p16-Deletionen bei ALL

<u>Autor</u>	<u>Journal, Datum</u>	<u>Material</u> ¹	<u>Alter</u> ²	<u>Methode</u> ³	<u>Anzahl Patienten</u>	<u>Ergebnis</u> ⁴	
						HomoDel	HemiDel
Quesnel et al.	Blood, 1995	ALL ⁶	k/a	SB, SSCP	n=63	14% (n=9)	0
Fizzotti et al.	Blood, 1995	B-Linien ALL	k/a	SB	n=47	17% (n=8)	0
Hayette et al.	Leukemia, 1997	Ph(+)- ALL	k/a	SB	n=17	41% (n=7)	0
Drexler	Leukemia, 1998 (Review)	B-Vorläufer- ALL	o.A.	o.A.	n=1037	23% (n=235)	
Ruas et al.	Biochimica et Biophysica Acta, 1998 (Review)	prä-B-ALL	o.A.	o.A.	n=530	21% (n=109)	o.A.
		pro-B-ALL	o.A.	o.A.	n=64	22% (n=14)	o.A.
		ALL ⁷	o.A.	o.A.	n=86	19% (n=16)	o.A.
Faderl et al.	Cytokines Cell Mol Ther, 1999	ALL ⁷	o.A.	SB	n=92	29% (n=27)	15% (n=14)
Faderl et al.	Clin Cancer Res, 1999	Ph(-)-ALL	a	SB	n=32	22% (n=7)	16% (n=5)
		Ph(+)-ALL	a	SB	n=10	40% (n=4)	10% (n=1)
Rieder et al.	Ann.Hematol. 80, suppl. II, 2001	Ph(+)-ALL	a	FISH	n=25	28% (n=7)	8% (n=2)

Erläuterungen zur Abbildung 4.1:

¹ **zu Material:** B-Linien-ALL: Philadelphia Chromosom positive und negative B-Vorläufer-ALL;

Ph(-)-ALL: Ph-negative B-Linien-ALL; Ph(+)-ALL: Ph-positive B-Linien-ALL;

AALL: ALL des Erwachsenen (Adulten)

² **zu Alter:** k: kindlich; a: adult; k/a: sowohl kindliche als auch adulte Fälle; o.A.: ohne Angabe

³ **zu Methode:** SB: Southern Blot

⁴ **zu Ergebnis:** HomoDel: homozygote Deletion; HemiDel: hemizygot Deletion

⁵ beinhaltet alle möglichen Zelllinien und Immunophänotypen; auch einzelne Ph(+)-Proben sind enthalten

⁶ nicht weiter differenziert

Es zeigt sich, daß die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen anderer Studien zu diesem Thema vergleichbar sind. Die erzielten Daten liegen mit einer Deletionsrate von 36% im mittleren Spektrum (14 – 50%).

Bemerkenswert ist hier, daß es mit Ausnahme von Einzelbeschreibungen keine andere Studie gibt, die ebenfalls die FISH als Nachweismethode von p16-Deletionen bei erwachsenen ALL Patienten verwendete. Die theoretischen Vorteile, die der Southern Blot aufgrund des ebenfalls möglichen Nachweises von kleineren Deletionen hat, verlieren vermutlich durch die Tatsache an Relevanz, daß es sich bei dem Großteil der p16-Deletionen von hämatopoetischen Tumoren nach der aktuellen Datenlage um größere Deletionen zu handeln scheint {Hirai et al. 1997}. In einer Studie zur kindlichen ALL konnten Okuda et al. bei 43 mit FISH und Southern Blot parallel untersuchten Patienten dennoch in zwei Fällen divergierende Ergebnisse nachweisen. Es handelte sich um Patienten, welche in der FISH-Untersuchung hemizygote Deletionen aufwiesen. Der Southern Blot wies jedoch biallelische Deletionen nach. Dennoch empfehlen Okuda et al. die FISH als Nachweismethode für p16-Deletionen, mit der Einschränkung, daß gefundene hemizygote Deletionen mittels Southern Blot überprüft werden sollten {Okuda et al. 1995}. Andererseits sehen manche Autoren die Vorteile der FISH insbesondere in der besseren Verlässlichkeit beim Nachweis von hemizygoten Deletionen und empfehlen gerade dort den Einsatz {Quesnel et al. 1996} {Drexler 1998}.

Weitere vergleichende Studien mit Southern Blot und paralleler FISH-Untersuchung an möglichst vielen adulten Ph+-ALL und Ph(-)-Patientenproben sind zur Klärung der Problematik erforderlich.

Im weiteren Vergleich meiner Ergebnisse mit denen von anderen Untersuchern ist auffallend, daß die Studien mit einem ausschließlich Philadelphia-Chromosom-positiven Patientengut tendentiell höhere Deletionsraten aufweisen. So finden Faderl et al. eine Gesamtdeletionsrate von 50%, gegenüber 38% bei den Ph-negativen Patienten in der gleichen Studie {Faderl et al. 1999}. Auch Hayette et al. liegen mit 41% und sogar ausschließlich homozygoten Deletionen über den Ergebnissen der anderen Autoren, die mit einer Ausnahme zwischen 14 und 23% pendeln {Hayette, Thomas, et al. 1997}. Die Ergebnisse meiner Studie unterstützen mit einer Gesamtdeletionsrate von 36% diesen Trend, wenngleich sie niedriger liegt als in den erwähnten Arbeiten.

Als mögliche Ausnahme von diesem Trend sollte jedoch eine weitere Studie von Faderl et al. erwähnt werden, die bei einem bezüglich des Ph-Chromosom-Status nicht differenzierten Patientengut die ebenfalls hohe Gesamtdeletionsrate von 44% nachweisen konnte {Faderl, Estrov, et al. 1999}. Interessant wäre es, den prozentualen Anteil der Ph+-Patienten dieser Studie zu kennen. Möglicherweise liesse sich dann auch hier der beobachtete Trend, daß das Vorhandensein eines Philadelphia-Chromosoms mit einer höheren Deletionsrate des Tumorsuppressorgens p16 einhergeht, bestätigen.

Einschränkend sei auf die großen Unterschiede in den Patientenzahlen hingewiesen. Allein der Review von Drexler überschaut die 20-fache Patientenzahl, verglichen mit der Summe aus den drei Studien, die ausschließlich Ph+-Patienten untersuchten, bzw. in denen Ph+-Patienten gesondert erwähnt werden {Drexler 1998}. Die beobachtete Tendenz zu höheren Deletionsraten bei diesen Patienten könnte sich darum nach Untersuchung einer höheren Fallzahl wieder ausgleichen .

Andererseits ist es aber auch denkbar, daß in den beschriebenen Studien mit hoher Fallzahl, die allesamt keine Differenzierung nach Ph-Status vorgenommen haben, die Gesamtdeletionsrate durch die möglicherweise weniger oft p16 deletierten, aber gleichzeitig zahlreicheren Ph(-)-Patienten erniedrigt wurde.

Hier ist wiederum eine wesentlich breitere und differenziertere Datenlage vonnöten, um die aufgestellten Hypothesen zu untermauern oder zu entkräften. Sinnvoll wäre es, wenn zukünftige Untersucher die Deletionsrate und deren Abhängigkeit vom Philadelphia-Chromosom-Status mit dokumentieren.

4.1.2 Zusammenhang von 9p-Deletionen mit dem Verlust von p16

Historisch gesehen geht die Entdeckung des Tumorsuppressorgens p16 auf die Beobachtung zurück, daß bei Patienten mit akuten lymphatischen Leukämien häufiger als bei Gesunden Veränderungen des kurzen Arms von Chromosom 9 aufzufinden sind. Zytogenetisch nachweisbar sind diese in 7-26% {Chilcote et al. 1985} {Carroll et al. 1987} {Pollak & Hagemeijer 1987} {Rieder et al. 1996}. Inzwischen ist bekannt, daß deutlich häufiger p16-Deletionen auftreten, als es durch die zytogenetische Untersuchung zu vermuten ist {Hirai et al. 1997}. So konnten Faderl et al. bei lediglich 12% der von ihnen mittels Southern Blot identifizierten ALL Patienten mit p16-

Deletionen ebenfalls zytogenetisch nachweisbare 9p Aberrationen feststellen {Faderl, Estrov, et al. 1999}. In einer weiteren Studie des gleichen Autors konnte in einer anderen Untersuchungsgruppe bei 11 Patienten mit p16-Deletion nur 27% (n=3) 9p-Aberrationen nachgewiesen werden {Faderl, Kantarjian, et al. 1999}.

In meiner Studie konnte ich bei 4 (44%) der 9 Patienten mit homozygoten und bei einem der beiden Patienten mit hemizygoten p16-Deletionen 9p-Aberrationen nachweisen. 9p-Veränderungen ohne p16-Deletion traten außer in einem gesondert behandelten Fall nicht auf, wenngleich auch diese bereits von anderen Untersuchern beschrieben wurden. Die Anzahl der zytogenetisch nachweisbaren 9p-Veränderungen betrug in meiner Studie 20% und lag damit im Bereich der oben dargestellten Ergebnisse von anderen Autoren.

Die Unterschiede im Verhältnis von 9p-Aberration zu p16-Deletion zwischen meinen Ergebnissen und den von Faderl mit mehreren anderen Untersuchern veröffentlichten Daten könnten teilweise durch bereits erwähnte Unterschiede im Patientenmaterial erklärlich sein. Insbesondere bei Faderl, Estrov et al. werden keine Unterschiede bzgl. Alter, Immunophänotyp und Philadelphia-Chromosom-Status der von ihnen untersuchten Patienten deutlich gemacht, so daß hier ein zumindest partiell bezüglich dieser Parameter divergierendes Patientengut angenommen werden muß {Faderl, Estrov, et al. 1999}.

Weiterhin sind nach der bereits oben erwähnten Arbeit von Okuda et al. methodisch bedingte Unterschiede möglich, da ich als einziger Untersucher mit der FISH arbeitete. Auch dies sollte, wie oben bereits angeregt, durch nachfolgende Studien weiter untersucht werden {Okuda et al. 1995}.

4.1.3 Zusammenhang von p16-Deletionen bei Ph+-ALL mit dem Immunophänotyp

Philadelphia-Chromosom-positive ALL-Blasten gehören nahezu immer zu den B-Vorläuferzellen {Linker 1997}. Dies trifft auch auf die von mir verwandten Patientenzellproben zu. Zu den B-Vorläuferzellen rechnet man die differenzierbaren Subgruppen pro-B-, common- und prä-B-ALL {EGIL, Bene et al. 1995}. Die Identifizierung einer pro-B- oder einer reifen B-ALL sind von klinischer Bedeutung.

Patienten mit pro-B-ALL werden einem Hochrisikobehandlungsprotokoll unterzogen. Patienten mit reifer B-ALL erhalten eine für das Burkitt's Lymphom/ALL konzipierte Therapie {Huh & Ibrahim 2000}. Früher galt auch das Vorhandensein von Myeloid-Antigenen bei Patienten mit common- oder prä-B-ALL als prognostisch ungünstig. Durch die modernen Therapieregime, insbesondere seit der zusätzlichen Einführung des Cyclophosphamids, der L-Asparaginase und der ZNS-Prophylaxe, sind jedoch keine Unterschiede mehr in der Häufigkeit des Erreichens der kompletten Remission und im Langzeitüberleben zwischen Patienten mit und ohne Koexpression von myeloischen Antigenen nachweisbar {Ogawa et al. 1995} {Czuczman et al. 1999}. In meiner Studie war lediglich ein einzelner Patient mit Myeloid-Antigen-positiver-C-ALL nachzuweisen. Das Tumorsuppressorgen p16 war bei diesem Patienten nicht deletiert. Andere Autoren berichten über wesentliche höhere Raten an Myeloid-Antigen-positiven Immunophänotypen bei den von ihnen untersuchten – teilweise allerdings kindlichen - Ph+-ALL-Patienten {Pui et al. 1993} {Khalidi et al. 1999}. Möglicherweise sind diese Unterschiede altersbedingt. Eine Beziehung zwischen p16-Deletion und dem Vorhandensein eines Myeloid-Antigen läßt sich aus der vorliegenden Studie aufgrund mangelnder Häufigkeit des Myeloid-Antigens nicht herstellen.

Ruas und Peters differenzierten die Ergebnisse in ihrem Review nach Immunophänotypen. Bei den B-Vorläuferzell-ALL-Patienten schwankte die Deletionsrate geringfügig zwischen 19% bei einer immunophänotypisch gemischten Gruppe und 22% bei der pro-B-ALL (wobei der Begriff „pro-B-ALL“ die C-ALL und die pro-B-ALL nach der EGIL-Klassifikation einschliesst) {Ruas & Peters 1998}. Die meisten anderen Autoren verzichteten auf Differenzierungen innerhalb der Gruppe der B-Vorläuferzell-ALL. In Anbetracht dieser Erläuterungen und der kleinen Fallzahl meiner Studie erscheint eine wertende Interpretation des p16-Status der untersuchten Patientenproben im Zusammenhang mit dem Immunophänotyp nicht sinnvoll.

4.1.4 Zusammenhang von p16-Deletionen bei Ph+-ALL mit dem Patientenalter

Es ist bekannt, daß die Häufigkeit des Auftretens der Philadelphia-Translokation mit dem Patientenalter positiv korreliert. Bezüglich der Häufigkeit von p16-Deletionen bei ALL konnte in vergleichenden Studien zwischen Kindern und Erwachsenen bislang keine ähnliche Korrelation gefunden werden {Ruas & Peters 1998}. Auch innerhalb meiner ausschließlich erwachsenen Studienpopulation ist kein Trend zu verzeichnen, der eine mit dem Alter ansteigende p16-Deletionsrate beweisen könnte. Zwar zeichnet sich ein leichter Anstieg in der Gruppe der 50-60-jährigen ab, nachfolgend kommt es jedoch wieder zu einem Abfall der p16-Deletionen. Eine realistische Einschätzung der Verhältnisse läßt sich jedoch nur durch Studien mit deutlich höheren Patientenzahlen erhalten.

4.1.5 Diskussion von divergierenden Befunden in FISH und Zytogenetik und deren Bedeutung

Wie unter 3.4 bereits beschrieben konnte bei dem Patienten 155/93 trotz einer nach der zytogenetischen Befundung zu erwartenden p16-Deletion (45,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)**dic(9;20)(p11;q11.1)**,der(22)t(9;22)(q34;q11)) in der FISH keine solche nachgewiesen werden.

Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen liegt im Patientenmaterial. Beim Eintreffen des Materials werden, wie in Kapitel 2 ausführlich erläutert, mehrere Kulturmedien mit dem Material beimpft und verschieden lange Kulturzeiten eingehalten. Dies erfolgt, da sich zu Beginn nie vorhersagen läßt, welches Medium und welche Kulturzeit am geeignetesten für die Patientenprobe ist. Leukämiezellen neigen dazu, bei langen Kulturzeiten (größer 48h) abzusterben. Bei einigen wenigen Präparaten jedoch erreicht man erst bei diesen langen Kulturzeiten gute Ergebnisse.

Das FISH-Untersuchungsmaterial des Patienten mit der Fallnummer 155/93 bestand aus einer einzelnen Knochenmarkprobe in einer 72-Stunden-Kultur. Möglicherweise ist es in dieser Kultur zu einem Absterben der Leukämiezellen gekommen, so daß lediglich ebenfalls vorhandene normale Leukozyten mit unauffälligem p16-Genstatus in der FISH markiert und untersucht worden sind, was den unauffälligen Befund erklärt.

Leider konnte zur Bestätigung dieser Theorie keine Untersuchung an anderen Kulturen dieses Patienten durchgeführt werden, da diese in den vorangegangenen vier Jahren zwischen Probenentnahme und FISH-Untersuchung verbraucht waren.

Die zytogenetische Untersuchung hingegen war bereits im Jahr 1993 an einer Probe mit kürzerer Kulturzeit und mit vitalen Leukämiezellen durchgeführt worden, denn sonst wären keine zytogenetischen Aberrationen gefunden worden. Außer der genannten Probe, die wegen der divergierenden Befunde aus der Auswertung herausgenommen wurde, wurden drei weitere Proben mit einer Kulturzeit von 72 Stunden untersucht: 01/92 kultiviert mit B/Mix72, 566/92 kultiviert mit K/R+T72 sowie 31/98 kultiviert mit KM72. In der Probe 01/92 konnte trotz langer Kulturzeit eine homozygote Deletion von p16 in der FISH nachgewiesen werden. Auch die Zytogenetik zeigte hier einen pathologischen Befund für Chromosom 9 (vgl. hierzu Tabelle 7.2.1).

Probe 566/92 sowie 31/98 zeigen in der zytogenetischen Untersuchung lediglich das Philadelphia-Chromosom als krankhafte Abweichung. Die FISH-Untersuchung war unauffällig.

In Abbildung 4.2 sind die Deletionsbefunde bei den einzelnen Kulturzeiten dargestellt:

Abbildung 4.2: Gegenüberstellung der Deletionsbefunde für p16 mit den Kulturzeiten

Kulturzeit	4h	24h	48h	72h
Homozygote Deletionen	0	6	1	1
Hemizygote Deletionen	2	0	0	0
Anzahl Kulturen insgesamt	5	13	6	4

Dieses, durch das vorhandene Patientenmaterial bedingte Problem kann zu einer Unterschätzung der p16-Deletionsrate führen. Im vorliegenden Fall könnten durch die beiden in der Auswertung verbliebenen und bezüglich des p16-Status unauffälligen 72h-Kulturen zwei p16-Deletionen möglicherweise nicht entdeckt worden sein – vorausgesetzt die Tumorzellen sind aufgrund der suboptimalen Kulturbedingungen abgestorben. Wenn beide Patientenproben tatsächlich p16-Deletionen aufgewiesen hätten, würde die Gesamtdeletionsrate hierdurch auf 44% ansteigen. Andererseits hätte die generelle Herausnahme der beiden Präparate aus der Wertung bedeutet, dass die

nachgewiesene p16-Deletionsrate ebenfalls durch die somit niedrigere Gesamtzahl von untersuchten Proben bei gleichbleibender Anzahl an deletierten Proben von 36% (9/25) auf 39% (9/23) erhöht würde. Typischerweise zeigen Präparate aus Kulturen mit nicht optimaler Kulturzeit oder Nährmedium Zeichen des Zelluntergangs, wie beispielsweise viele apoptotische Zellen oder Zelldebris. Dies lag jedoch in den vorliegenden Fällen nicht vor. Im Präparat 357/96 finden sich bei einer Kulturzeit von 4h viele solcher Anzeichen für Zelluntergang, weshalb dieses Präparat aufgrund der stark eingeschränkten Beurteilbarkeit aus der Bewertung gänzlich herausgenommen wurde.

Ich entschloss mich darum, die Präparate aus den 72h-Kulturen mit in die Studie einzubeziehen, allerdings mit dem Hinweis auf eine hierdurch mögliche geringe Beeinflussung des Endergebnisses im Sinne einer Unterschätzung der Gesamtdeletionsrate. Zu fordern ist für zukünftige Untersuchungen die Durchführung der zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchung aus der gleichen Probenkultur.

4.2 Häufigkeit von TP53 Deletionen bei der Ph(+)-ALL des Erwachsenen

Die Häufigkeit von TP53-Mutationen (einschliesslich Deletionen) bei akuten lymphatischen Leukämien wird in der Literatur mit 2-3% angegeben. Die Untersuchungen beziehen sich zum allergrößten Teil auf Kinder und Philadelphia negative Patienten {Sugimoto et al. 1991} {Fenaux et al. 1992} {Imamura et al. 1994} {GFCH 1996} {Faderl et al. 1998}. Neben den für TP53 typischen Punktmutationen wird hierbei häufig eine Untergruppe mit Verlust eines distalen Teils des kurzen Arms von Chromosom 17 beschrieben, bei der es zusätzlich im Sinne eines „Loss of heterozygosity“ häufig zu Punktmutationen im verbleibenden Allel kommt {Miyagi et al. 1993} {Nakai et al. 1993}. Die initialen Deletionen entstanden oft durch die Bildung eines Isochromosoms 17q, welches bei der ALL eines der am häufigsten aufzufindenden Isochromosomen ist {Pui et al. 1992} {Mertens et al. 1994} {Martineau et al. 1996}.

Bei der Blastenkrise der CML stellt das Isochromosom 17q mit 30% die häufigste zusätzliche Chromosomenaberration dar. Hierbei kommt es in ca. 20% zu Deletionen

von TP53 {Kelman et al. 1989} {Feinstein et al. 1991} {Nakai et al. 1992} {Mitelman 1993} {Guinn 1997}.

Auch Mertens et al. berichten in ihrem Review zur Häufigkeit von Isochromosomen bei Tumoren über die besondere Position des i17q als dem am häufigsten nachweisbaren Isochromosom bei nahezu allen Tumortypen. Für die Ph(+)-lymphatischen Neoplasmen beschreiben sie eine Häufigkeit von 2-4% {Mertens et al. 1994}.

Soenen et al. beschreiben ein 17p-Syndrom bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und akuter myeloischer Leukämie, welches bei 3-4% aller betroffenen Patienten vorkommt, zu einer TP53 Deletion führt und mit morphologischen Veränderungen der Leukozyten einhergeht. Sie untersuchten 16 Patienten mit zytogenetisch nachweisbaren 17p-Aberrationen mittels FISH und konnten bei 14 Patienten TP53-Deletionen nachweisen. In einem weiteren Schritt wurden mittels SSCP und immunozytochemischer Analyse 13 der mit FISH voruntersuchten Patienten auf Punktmutationen im verbleibenden Allel überprüft, welche in 7 Fällen nachgewiesen werden konnten {Soenen et al. 1998}.

Nakai et al. untersuchten 17 adulte Ph(+)-ALL-Patienten auf TP53-Mutationen, wovon bei vieren zum Untersuchungszeitpunkt ein Rezidiv vorlag. Zwei von den vier Rezidivpatienten wiesen Chromosom 17p-Aberrationen mit TP53-Deletionen auf. In einem Fall handelte es sich um ein Isochromosom 17q, im anderen um einen kompletten Verlust eines Chromosom 17. Auf dem verbliebenen Allel war es in beiden Fällen zu Punktmutationen im Sinne eines „Loss of heterozygosity“ gekommen. Bei den anderen 15 untersuchten Patienten, welche keine zytogenetischen Auffälligkeiten des Chromosom 17 aufwiesen, konnten lediglich eine weitere Punktmutation und ein weiteres chromosomales Rearrangement nachgewiesen werden. Nakai et al schliessen daraus, dass die Häufigkeit von TP53-Mutationen deutlich erhöht ist, wenn zuvor bereits ein Allel verlorengegangen ist. Darüber hinaus sehen sie kaum Anhalt für die Existenz von TP53-Mutationen bei zytogenetisch unauffälligem Chromosom 17 {Nakai et al. 1993}.

Auf der Grundlage dieser bereits von anderen Untersuchern durchgeführten Studien stellte ich mir die Frage, ob der Mechanismus der TP53-Deletion, beispielsweise durch Bildung eines Isochromosom 17q, für die Ph(+)-ALL des Erwachsenen möglicherweise von besonderer Bedeutung ist. Die vorhandenen Studien erfassen erwachsene Ph(+)-ALL-Patienten nur in Einzelfällen. In diesen Fällen handelt es sich in der Regel um

Patienten im Rezidiv {Nakai et al. 1993}. Eine größere Gruppe dieses speziellen Patientenguts wurde nach meiner Recherche auf diese Fragestellung hin noch nicht untersucht.

Bei den von mir mittels FISH untersuchten 27 erwachsenen Patienten mit Ph+-ALL konnte bei einem 40-jährigen männlichen Patienten mit der Erstdiagnose Ph(+)-ALL eine hemizygote Deletion nachgewiesen werden (3,7%). Diese war durch ein Isochromosom 17q verursacht:

Pat. 317/92, Karyotyp: 46,XY,dup(1)(q23q32),t(9;22)(q34;q11),del(16)(q11),**i(17)(q10)**.

Eine homozygote Deletion von TP53 ließ sich bei keinem der von mir untersuchten Patienten nachweisen. Außer dem zur TP53-Deletion führenden i17q ließ sich auch kein weiteres Isochromosom 17 nachweisen.

Möglicherweise sind die deutlicheren Ergebnisse von Nakai et al. bzgl. TP53 Deletionen (11% VS. 3,7%) auf die Tatsache zurückzuführen, dass er auch Rezidivpatienten untersuchte und die gefundenen TP53-Deletionen ausschliesslich bei diesen Rezidivpatienten nachweisbar waren. Bereits andere Autoren konnten zeigen, dass Patienten im Rezidiv oder bei Krankheitsprogression höhere TP53-Mutationsraten aufweisen als zu Beginn der Erkrankung {Miwa et al. 1992} {Imamura, Miyoshi, et al. 1994 29 /id}.

Alle anderen Untersucher von TP53-Deletionen bei ALL nahmen zumeist keine Differenzierung bzgl. Ph(+)-Status und Patientenalter vor, so dass die Vergleichbarkeit hier geringer ist.

Fenaux et al. untersuchten 60 kindliche und erwachsene ALL Patienten, wovon 8 ein Philadelphia-Chromosom aufwiesen. Bei drei Ph(-)-Patienten (5%) mit zytogenetisch unauffälligem Chromosom 17 konnte eine Punktmutation nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei zwei Patienten eine 17p-Monosomie ohne zusätzliche TP53 Mutation auf dem verbliebenen Allel nachgewiesen werden. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass anders als bei der AML und dem myelodysplastischen Syndrom bei der ALL, kein Zusammenhang zwischen zytogenetischer Chromosom-17-Aberration und TP53-Mutation auf der verbliebenen Allel vorliegt. Leider wurden das Patientenalter und der Philadelphia-Chromosom Status nur in Einzelfällen aufgeführt {Fenaux et al. 1992}.

Wada et al. untersuchten 330 Kinder mit ALL. Von 8 Fällen mit nachweisbarer TP53 Mutation befanden sich zwei im Rezidiv. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren keine Mutationen nachgewiesen worden. Die einzelnen Karyotypen sind nicht dokumentiert oder erwähnt, so dass bezüglich 17p Deletionen oder i(17q) keine Aussage möglich ist. Die Autoren interpretierten die gefundene Mutationsrate von 2% als geringer, verglichen mit der von erwachsenen ALL-Patienten, wobei als wesentlicher Bezugspunkt die oben erwähnte Studie von Fenaux et al (5% Mutationen) genannt wird {Wada et al. 1993}.

Imamura et al. beschrieben in einem Review bei einem nicht nach Philadelphia-Chromosom und Alter differenzierten Patientengut, welches sich jedoch im wesentlichen auf die große an Kindern durchgeführte Studie von Wada et al. bezieht, eine TP53-Mutationsrate von 3% für die C-ALL. TP53-Deletionen werden nicht gesondert aufgeführt (s. Tabelle 4.3) {Wada et al. 1993} {Imamura et al. 1994}.

Abbildung 4.3: Beschreibung nach Imamura, Miyoshi, et al. 1994

<u>Leukämie Subtyp</u>	<u>Häufigkeit von TP53-Mutationen</u>
ALL L3	ca. 50%
Rezidierte T-ALL	ca. 30%
Blastenkrise der CML	ca. 20-30%
AML	ca. 15%
CLL	ca. 15%
C-ALL	ca. 3%
T-ALL Erstdiagnose	Selten

Anzumerken ist, daß neben TP53-Deletionen auch andere Mechanismen zu einem Fehlen oder einer Dysfunktion des Transkriptionsfaktors p53, dem Produkt von TP53, führen können. Neben Punktmutationen, welche durch die FISH nicht nachgewiesen werden können, aber bei vorhandenen Deletionen in einigen Fällen auf dem verbleibenden Allel im Sinne eines „Loss of heterozygosity“ auftreten, sind Mutationen an regulatorischen Gensequenzen, Hypermethylierungen von Promoterregionen, veränderte Proteinexpression, beispielsweise durch Expression von inhibierenden Proteinen, und weitere mehr bekannt. Die vorliegende Untersuchung und die hier getroffenen Aussagen beschränken sich auf den Nachweis von TP53-Deletionen bei

erwachsenen Ph(+)-ALL Patienten, soweit sie durch die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung und die konventionelle Zytogenetik diagnostizierbar sind.

Zusammenfassend lässt sich nach den Ergebnissen dieser Studie und der recherchierbaren Literatur zu diesem Thema sagen, dass TP53 Deletionen in einem geringen Prozentsatz von etwa 3% bei der Ph(+)-ALL des Erwachsenen auftreten. Ihr Vorhandensein wird bei Nachweis eines Isochromosom 17q oder einer zytogenetischen sichtbaren Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 zunehmend wahrscheinlich. Zumindest bei Patienten mit der Erstdiagnose adulte Ph(+)-ALL scheint es keinen Unterschied in der Häufigkeit der TP53-Deletionen im Vergleich mit Philadelphia negativen und jungen Patienten zu geben.

Weitere Untersuchungen der Charakteristika der Ph(+)-ALL des Erwachsenen sind sinnvoll, da die Datenlage weiterhin nicht ausreichend erscheint. Ziel sollte es sein, weitere Untergruppen mit auch möglicherweise klinisch differierenden Charakteristika zu differenzieren, um anschliessend eine auf diese Pathomechanismen ausgerichtete massgeschneiderte Therapie entwickeln zu können.

4.2.1 Zusammenhang von TP53 Deletionen bei Ph+-ALL mit dem Immunophänotyp und dem Patientenalter

Bei der Patientenprobe mit der festgestellten hemizygoten Deletion für TP53 handelte es sich um einen 40-jährigen männlichen Patienten mit der Erstdiagnose einer pro-B-ALL. Außer der unter 4.3 tabellarisch aufgeführten Differenzierung der TP53 Mutationsraten bei den gesamten Leukämien finden sich in der Literatur kaum Präferenzen für einen bestimmten Immunotyp innerhalb der B-Zell-Vorläuferreihe. In Anbetracht der insgesamt niedrigen Mutationsrate erscheint dies jedoch nicht verwunderlich. Eine Aussage zum Einfluß des Immunotyps auf die Isochromosom 17q Bildung oder die TP53 Deletionsrate lässt sich anhand der von mir erhobenen Daten nicht treffen .

4.3 Diskussion der Ausschlußkriterien der Signalauswertung

Wie bereits unter 3.1 erwähnt und in Abbildung 3.1 und 3.10 in Tabellenform (grau unterlegt) dargestellt, konnten einige Werte, obwohl sie über dem CutOff lagen, keiner sinnvollen Interpretation zugeführt werden. Das Verteilungsmuster dieser Werte über der Auswertungsschablone ist diffus. Mit einer Ausnahme (p16 Markierung bei 468/93) zeigen sie sich nicht in Feldern, in denen sie für eine homo- oder hemizygote Deletion stehen würden.

Im genannten Fall 468/93 ist eine hemizygote Deletion bereits evident. Tatsächlich ist es hier möglich, dass eine weitere kleine Subpopulation mit einer homozygoten Deletion im Untersuchungsmaterial nachgewiesen worden ist, da auch bei homozygoten Deletionen der Allelverlust oft zweizeitig erfolgt.

Auffällig ist, dass auch in den Fällen mit diffuser Streuung eher Proben mit nachgewiesener Deletion betroffen sind. Dies kann ein Hinweis auf eine mögliche stärkere Degeneration der DNA im Rahmen der fortschreitenden Erkrankung und ein hierdurch bedingt verändertes Markierungsverhalten sein.

Weiterhin kann die Ursache in einer unterschiedlichen Markierbarkeit der einzelnen Proben aufgrund der oben beschriebenen Diversität der Proben bezüglich Alter und initialer Präparation zu finden sein. Tatsächlich war die Qualität der Sondenmarkierung nicht uniform, und neben schwachen Markierungen zeigten sich intermittierend auch Proben mit starker Hintergrundmarkierung, welche auch in Kontrolluntersuchungen bestehen blieb. Eine Beeinträchtigung der Auswertung im Rahmen der Fragestellung ist hierdurch aber nicht gegeben, da nur Proben ausgewertet wurden, deren Signalmarkierung ausreichend sicher war.

5. Zusammenfassung

Die Philadelphia-Chromosom-positive akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen ist im wesentlichen gekennzeichnet durch das Philadelphia-Chromosom und die damit korrelierende schlechte Prognose. Durch die Entwicklung des Tyrosinkinase Inhibitors Imatinib (Glivec®) konnte erstmals ein am Anfang der Tumorentstehung stehender, durch das Philadelphia-Chromosom charakterisierter Pathomechanismus durchbrochen werden. Da Tumoren zumeist durch eine Kombination mehrerer Pathomechanismen entstehen, geht die Suche nach weiteren Bausteinen der Tumorigenese weiter. Als vielversprechend erscheinen Tumorsuppressorgene wie p16 und TP53, deren Bedeutung für die Tumorentstehung in vielen Studien belegt ist.

In der vorliegenden Studie konnte in einer Untersuchung an 25 erwachsenen Patienten mit Ph(+)-ALL mittels Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung bei 7 Patienten homozygote (28%) und bei 2 Patienten hemizyogte Deletionen von p16 (8%) nachgewiesen werden. Zusammengefasst zeigt sich also bei gut einem Drittel (36%) der Ph(+)-ALL-Patienten ein Verlust des Tumorsuppressorgens p16. Vier der Patienten mit Deletionen wiesen auch zytogenetisch nachweisbare Veränderungen am kurzen Arm von Chromosom 9, auf dem das p16 Gen lokalisiert ist, auf.

Weiterhin untersuchte ich 27 Ph(+)-ALL-Patienten mittels FISH auf Deletionen des Tumorsuppressorgens TP53. Hierbei konnte in einem Fall, bedingt durch ein Isochromosom 17q, ein hemizygot deletiertes TP53 nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei erwachsenen Patienten mit Ph(+)-ALL-Deletionen von TP53 nicht häufiger vorkommen als bei Kindern und Philadelphia negativen Patienten. Wenn sie jedoch auftreten, dann ist das Isochromosom 17q eines der am häufigsten nachweisbaren chromosomalen Aberrationen.

6. Referenzen

1. Ahuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, Advani S, Allen SL, Goldman J et al. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J Clin.Invest* 1991;87(6):2042-7.
2. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *Br J Haematol* 1976;33:451-8.
3. Bienz-Tadmor, B, Zakut-Houri, R, Libresco, S, Givol, D, and Oren, M. The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J* 4, 3209-3213. 1985.
4. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7(6):1513-23.
5. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby D et al. Rates of p16(MTS1) Mutations in Primary Tumors with 9p Loss. *Science* 1994;265(415-417).
6. Carroll AJ, Castleberry RP, Crist WM. Lack of association between abnormalities of the chromosome 9 short arm and either "lymphomatous" features or T cell phenotype in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* 1987;69(3):735-8.
7. Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, Hanslip J, Yoshida N et al. A Classification of acute leukaemia for the 1990s. *Ann Hematol* 1991;62:16-21.
8. Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G, Knowles D. Structural and Functional Analysis of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Shows Frequent p53 Mutations. *Blood* 1992;80:3205-16.
9. Chan, LC, Karhi, KK, Rayter, SI, Heisterkamp, N, Eridani, S, Powles, R, Lawler, SD, Groffen, J, Foulkes, JG, Greaves, MF, and Wiedemann, LM. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325, 635-637. 1987.
10. Chessells JM, Hall E, Prentice HG, Durrant J, Bailey CC, Richards SM. The impact of age on outcome in lymphoblastic leukaemia; MRC UKALL X and XA compared: a report from the MRC Paediatric and Adult Working Parties. *Leukemia* 1998;12(4):463-73.
11. Chilcote RR, Brown E, Rowley JD. Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9. *N Engl J Med* 1985;313(5):286-91.
12. Clark, SS, McLaughlin, J, Crist, WM., Champlin, R, and Witte, ON. Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. *Science* 235, 85-88. 1987.

13. Cline, MJ. The Molecular Basis of Leukemia. *N Engl J Med* 330(5), 328-336. 1994.
14. Copelan E, McGuire E. The Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Blood* 1995;85(5):1151-68.
15. Cremer, T, Jauch, A, Ried, T, Schröck, E, Lengauer, C, Cremer, M, and Speicher, MR. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). *Dt Ärztebl* 92(22), A-1593-1601. 1995.
16. Czuczman MS, Dodge RK, Stewart CC, Frankel SR, Davey FR, Powell BL et al. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia Group B study 8364. *Blood* 1999;93(11):3931-9.
17. Dicciani M, Batova A, Yu J, Vu T, Pullen J, Amylon M et al. Shortened Survival after relapse in T-Cell acute lymphoblastic leukemia patients with p16/p15 deletions. *Leukemia Res* 1997;21:549-58.
18. Drexler H. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998;12:845-59.
19. Dreyling M, Kobayashi H, Olopade O, Beau ML, Rowley J, Bohlander S. Detection of 9p Deletions in Leukemia Cell Lines by Interphase Fluorescence In Situ Hybridization with YAC-derived Probes. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;83:46-55.
20. Druker B, Sawyers C, Kantarjian H, Resta D, Reese S, Ford J et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N Engl J Med* 2001;344(14):1038.
21. EGIL, Bene M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig W, Matutes E et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995(9):1783-6.
22. Eliyahu D, Michalowitz D, Oren M. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* 1985;316:158.
23. Eliyahu D, Goldfinger N, Pinhasi-Kimsi O, Shaulsky G, Skurnik Y, Arai N et al. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* 1988;3:313.
24. Eliyahu D, Michalowitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimsi O, Oren M. Wild type p53 can inhibit oncogene mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8763.
25. Erber WN. Human leucocyte differentiation antigens: review of the CD nomenclature. *Pathology* 1990;22(2):61-9.
26. Faderl S, Kantarjian H, Talpaz M, Estrov Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1998;91(11):3995-4019.

27. Faderl S, Estrov Z, Kantarjian HM, Thomas D, Cortes J, Manshour T et al. The incidence of chromosome 9p21 abnormalities and deletions of tumor suppressor genes p15(INK4b)/p16(INK4a)/p14(ARF) in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cytokines Cell Mol.Ther.* 1999;5(3):159-63.
28. Faderl S, Kantarjian HM, Manshour T, Chan CY, Pierce S, Hays KJ et al. The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF and p15INK4b deletions in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin.Cancer Res* 1999;5(7):1855-61.
29. Faderl S, Kantarjian HM, Estey E, Manshour T, Chan CY, Rahman EA et al. The prognostic significance of p16(INK4a)/p14(ARF) locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2000;89(9):1976-82.
30. Faderl S, Kantarjian HM, Thomas DA, Cortes J, Giles F, Pierce S et al. Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk.Lymphoma* 2000;36(3-4):263-73.
31. Faderl S, Albitar M. Insights into the biologic and molecular abnormalities in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol.Clin.North Am.* 2000;14(6):1267-88.
32. Faderl, S. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 98(7), 1337-1354. 2003.
33. Felix C, D'Amico D, Mitsudomi T, Nau M, Li F, JF Fraumeni J et al. Absence of hereditary p53 mutations in 10 familial leukemia pedigrees. *Journal of Clinical Investigation* 1992;90:653-8.
34. Fenaux P, Jonveaux P, Quiqandon I, Preudhomme C, Lai J, Vanrumbeke M et al. Mutations of the p53 Gene in B--Cell Lymphoblastic Acute Leukemia: a Report on 60 cases. *Leukemia* 1992;6:42-6.
35. Fields, S and Jang, SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046-1049. 1990.
36. Fizzoti M, Cimino G, Pisegna S, Alimena G, Quartarone C, Mandelli F et al. Detection of Homozygous Deletions of the Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor (p16) Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia and Association With Adverse Prognostic Factors. *Blood* 1995;85(2685-2690).
37. Foon K, Todd R. Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma. *Blood* 1986;68(1):1-31.
38. Fraser G, Hart D, Keaton D, Hamer J, Allen J, Beard M. Adolescent and Adult Lymphoblastic Leukaemia: Prognostic Factors and Response to Treatment. *Hematological Oncology* 1985;3:211-6.
39. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma

and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1991;88(12):5413-7.

40. Gebhart E, Liehr T, Harrer P, Reichardt S, Schmitt G, Thoma K et al. Determination of Interphase-FISH of the Clonality of Aberrant Karyotypes in Human Hematopoietic Neoplasias. *Leukemia and Lymphoma* 1994;17:295-302.
41. GFCH. Groupe Francais de Cytogénétique Hématologique - Collaborative study of karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemias. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Leukemia* 1993;7(1):10-9.
42. GFCH. Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Correlations with Hematologic Findings and Outcome. A Collaborative Study of the Groupe Francais de Cytogénétique Hématologique. *Blood* 1996;87(8):3135-42.
43. Greaves, M. A natural history for pediatric acute leukemia. *Blood* 82, 1043-1051. 1993.
44. Greaves M. An Immunological Window on Leukaemia. *Immunology* 1989(Suppl.2):56-63.
45. Guinn B, Padua R. p53: A role in the initiation and progression of leukaemia? *Cancer Journal* 1997;8:Online-Version.
46. Haidar M, Cao X, Manshouri T, Chan L, Glassman A, Kantarijan H et al. p16/INK4a and p15/INK4b gene deletions in primary leukemias. *Blood* 1995;86:311-5.
47. Harlow, E, Williamson, NM, Ralston, R, Helfman, DM, and Adams, TE. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *mol cell biol* 5, 1601-1610. 1985.
48. Harper ME, Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 1981;83(3):431-9.
49. Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A, Donehower L. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nature Genetics* 1995;9:305-11.
50. Hayette S, Thomas X, Bertrand Y, Tigaud I, Callanan M, Thiebaut A et al. Molecular analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors in human leukemias. *Leukemia* 1997;11:1696-9.
51. Helenglass G, Testa J, Schiffer C. Philadelphia chromosome-positive acute leukemia: morphologic and clinical correlations. *Am.J Hematol* 1987;25(3):311-24.
52. Herskovitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987;329:219-22.

53. Hirai H, Ogawa S, Hangaishi A, Takahashi T, Kurokawa M, Mitani K et al. Recent Progress In Molecular Mechanisms of Leukemogenesis: the Cyclin-Dependent Kinase 4-Inhibitor Gene in Human Leukemias. *Leukemia* 1997;11 Suppl.3:358-60.
54. Hirama T, Koeffler HP. Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitors in the Developent of Cancer. *Blood* 1995;86:841-54.
55. Hoelzer D, Thiel E, Loffler H, Buchner T, Ganser A, Heil G et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988;71(1):123-31.
56. Hoelzer D. Which factors influence the different outcome of therapy in adults and children with ALL? *Bone Marrow Transplant.* 1989;4 Suppl 1:98-100.
57. Hoelzer D. Change in treatment strategies for adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) according to prognostic factors and minimal residual disease. *Bone Marrow Transplant.* 1990;6 Suppl 1:66-70.
58. Hoelzer D. Therapy and prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Clin.Haematol* 1994;7(2):299-320.
59. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. p53 Mutations in Human Cancers. *Science* 1991;253:49-53.
60. Huh YO, Ibrahim S. Immunophenotypes in adult acute lymphocytic leukemia. Role of flow cytometry in diagnosis and monitoring of disease. *Hematol Oncol.Clin.North Am.* 2000;14(6):1251-65.
61. Hunter T. Braking The Cycle. *Cell* 1993;75:839-41.
62. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler H. p53 in Hematologic Malignancies. *Blood* 1994;84:2412-21.
63. Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C et al. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat.Genet.* 1994;6(1):84-9.
64. Issa J, Baylin S, Herman J. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia* 1997;11:7-11.
65. John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223(206):582-7.
66. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264(5157):436-40.
67. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV et al. A Cell Cycle Regulator Potentially Involved in Genesis of Many Tumor Types. *Science* 1994;264:436-40.

68. Kantarjian, HM, Talpaz, M, Dhingra, K, Elihu, E, Keating, M. J., Ku, S, Trujillo, J., Huh, Y, Stass, S, and Kurzrock, R. Significance of the p210 Versus p190 Molecular Abnormalities in Adults With Philadelphia Chromosome-Positive Acute Leukemia. *Blood* 78(9), 2411-2418. 1991.
69. Kees UR, Burton PR, Lü C, Baker DL. Homozygous Deletion of the p16/MTS1 Gene in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated With Unfavourable Clinical Outcome. *Blood* 1997;89:4161-6.
70. Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins JL et al. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. *Am.J Clin.Pathol.* 1999;111(4):467-76.
71. Knapp W, Rieber P, Dorken B, Schmidt RE, Stein H, v.d.Borne AE. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today* 1989;10(8):253-8.
72. Knapp W, Dorken B, Rieber P, Schmidt RE, Stein H, dem Borne AE. CD antigens 1989. *Blood* 1989;74(4):1448-50.
73. Knudson A. Mutation and cancer:statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-6.
74. Kowalczyk J, Sandberg AA. A possible subgroup of ALL with 9p-. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1983;9(4):383-5.
75. Kurzrock, R, Shtalrid, M., Romero, P, Kloetzer, WS, Talpaz, M, Trujillo, JM, Blick, M, Beran, M, and Gutterman, JU. A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325, 631-635. 1988.
76. Lai JL, Fenaux P, Pollet JP, Estienne MH, Savary JB, Huart JJ et al. Acute lymphocytic leukemia with 9p anomalies. A report of four additional cases and review of the literature. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1988;33(1):99-109.
77. Lane D, Crawford L. T antigen is bound to a host protein in SV-40-transformed cells. *Nature* 1979;278(261).
78. Lathan, B, Pfreundschuh, M, and Diehl, V. Leukämien. *Innere Medizin* 3, 170-180. 1994. Urban & Schwarzenberg.
79. Leblanc T, Derre J, Flexor M, Le Coniat M, Leroux D, Rimokh R et al. FISH analysis of translocations involving the short arm of chromosome 9 in lymphoid malignancies. *Genes Chromosomes.Cancer* 1997;19(4):273-7.
80. Leitch A, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch I. *In Situ-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*; 1994.
81. Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.

82. Linker C. Risk-adapted treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1997;11(Suppl.4):24-7.
83. Löffler H. Biochemical properties of leukemic blast cells revealed by cytochemical methods: Their relation to prognosis. In: Fliedner T, Perry S, editors. *Prognostic Factors in Human Acute Leukemias - Advances in Biosciences*. 14 ed. Braunschweig: Pergamon; 1975. p. 163-73.
84. Ludwig WD, . Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993;82(10):3163-9.
85. Ludwig WD, . Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993;82(10):3163-9.
86. Mark HF, Przygoda JJ, Sikov W. Fluorescent in situ hybridization for identifying cytogenetic abnormalities in inadequate and suboptimal specimens. *Pathobiology* 1998;66(5):216-20.
87. Martineau, M, Clark, R, Farrell, DM, Hawkins, JM, Moorman, AV, and Secker-Walker, LM. Isochromosomes in acute lymphoblastic leukaemia: i(21q) is a significant finding. *Genes Chromosomes.Cancer* 17, 21-30. 1996.
88. Marx J. How Cells Cycle Toward Cancer. *Science* 1994;263:319-21.
89. Mashal R, Shtalrid M, Talpaz M, Kantarjian H, Smith L, Beran M et al. Rearrangement and expression of p53 in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990;75(1):180-9.
90. Masuhr, KF and Neumann, M. *Neurologie*. Neurologie 4.Auflage, 316-317. 1998.
91. Mauer AM. Adult and childhood acute lymphocytic leukemia: are they different diseases? *Am.J Hematol* 1993;42(1):127-31.
92. Merlo A, Herman J, LM, Lee D, Gabrielson E, Burger P et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med* 1995;1:686-92.
93. Mertens F, Johansson B, Mitelman F. Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes.Cancer* 1994;10(4):221-30.
94. Messerer D. How representative is the GMALL study of the German population? *Ann Hematol* 2001;80(Suppl.2):27.
95. Michalowitz D, Halevy O, Oren M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 1990;62:671.
96. Miller CW, Koeffler HP. b Cyclin-dependent kinase inhibitors in human neoplasms. *Leukemia* 1997;11(Suppl.3):370-1.
97. Mitelman, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk.Lymphoma* 11 Suppl.1, 11-15. 1993.

98. Miwa H, Kita K, Saya H, Otsuji A, Masuya M, Nishii K et al. Structural Alterations of the p53 Gene in Human Leukemias. *Leukemia Research* 1992;16:1105-12.
99. Miyagi T, Ohyashiki J, Yamato K, Koeffler H, Miyoshi I. Phenotypic and molecular analysis of Ph1-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Int J Cancer* 1993;53(3):457-62.
100. Mori, N, Wada, M, Yokota, J, Terada, M, Okada, M, Teramura, M, Masuda, M, Hoshino, S, Motoji, T, and Oshimi, K. Mutations of the p53 tumour suppressor gene in hematologic neoplasms. *Br J Haematol* 81, 235-240. 1992.
101. Nakai, H., Misawa, S., Toguchida, J., Yandell, DW, and Ishizaki, K. Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia, especially in myeloid crisis harboring loss of a chromosome 17p. *Cancer Research* 52. 1992.
102. Nakai H, Misawa S, Tanaka S, Nishigaki H, Taniwaki M, Yokota S et al. p53 Gene Mutation and Loss of a Chromosome 17p in Philadelphia Chromosome (PH1)-Positive Acute Leukemia. *Leukemia* 1993;7:1547-51.
103. Nobori T, Miura K, Wu D, Lois A, Takabayashi K, Carson D. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-6.
104. Nowell, PC and Hungerford, DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497. 1960.
105. Nowell P. What Causes Lymphocytic Tumors? *Cancer Investigation* 1990;8(1):49-57.
106. Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, Hirosawa S, Miura Y, Takeyama K et al. Loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16; MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood* 1995;86(4):1548-56.
107. Ogawa S, Hirano N, Takahashi T, Hangaishi A, Tanaka K, Kurokawa M et al. Homozygous Loss of the Cyclin-Dependent Kinase 4-Inhibitor (p16) Gene in Human Leukemias. *Blood* 1994;8:2431-5.
108. Ohnishi H, Guo SX, Ida K, Taki T, Naritaka S, Bessho F et al. Alterations of p16 and p15 genes in acute leukemia with MLL gene rearrangements and their correlation with clinical features. *Leukemia* 1997;11(12):2120-4.
109. Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F et al. Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85(9):2321-30.
110. Olopade O, Bohlander S, Pomykala H, Maltepe E, Melle EV, MLB et al. Mapping of the Shortest Region of Overlap of Deletions of the Short Arm of Chromosome 9 Associated with Human Neoplasia. *Genomics* 1992;14:437-43.

111. Omura-Minamisawa M, Diccianni MB, Batova A, Chang RC, Bridgeman LJ, Yu J et al. Universal inactivation of both p16 and p15 but not downstream components is an essential event in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin.Cancer Res* 2000;6(4):1219-28.
112. Pallesen G, Plesner T. The third international workshop and conference on human leukocyte differentiation antigens with an up-to-date overview of the CD nomenclature. *Leukemia* 1987;1(3):231-4.
113. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1969;64(2):600-4.
114. Pendergast, AM, Muller, AJ, Havlik, MH, Maru, Y, and Witte, ON. BCR sequences essential for transformation by the bcr-abl oncogene bind to the abl SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 66, 161-171. 1991.
115. Perentesis J. Why is age such an important independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 1997;11(Suppl.4):4-7.
116. Pinkel D. Therapy of acute lymphoid leukemia in children. *Leukemia* 1992;6 Suppl 2:127-31.
117. Pollak C, Hagemeijer A. Abnormalities of the short arm of chromosome 9 with partial loss of material in hematological disorders. *Leukemia* 1987;1(7):541-8.
118. Prokocimer M, Rotter V. Structure and Function of p53 in Normal Cells and Their Aberrations in Cancer Cells: Projection on the Hematologic Cell Lineages. *Blood* 1994;84:2391-411.
119. Propp, S and Lizzi, FA. Philadelphia chromosome in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 36, 353-360. 1970.
120. Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, Schell MJ, Head DR, Shuster JJ, Crist WM, Borowitz MJ, Link MP, Behm FG, Steuber CP, and Land VJ. Isochromosomes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Collaborative Study of 83 Cases. *Blood* 79(9), 2384-2391. 1992.
121. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82(2):343-62.
122. Quesnel B, Preudhomme C, Philippe N, Vanrumbeke M, Dervite I, Lai JL et al. p16 gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85(3):657-63.
123. Quesnel B, Preudhomme C, Fenaux P. p16ink4a gene and hematological malignancies. *Leuk.Lymphoma* 1996;22(1-2):11-24.
124. Quesnel B, Preudhomme C, Lepelley P, Hetuin D, Vanrumbeke M, Bauters F et al. Transfer of p16inka/CDKN2 gene in leukaemic cell lines inhibits cell proliferation. *Br.J Haematol.* 1996;95(2):291-8.

125. Quesnel B. Cyclin/CDK inhibitors of the 9p21 chromosomal region and hematological malignancies. *Bull.Cancer* 1998;85(9):747.
126. Ragione FD, Iolascon A. Inactivation of cyclin-dependent kinase inhibitor genes and development of human acute leukemias. *Leuk.Lymphoma* 1997;25(1-2):23-35.
127. Rasool O, Heyman M, Brandter L, Liu Y, Grander D, Soderhall S et al. p15ink4B and p16ink4 gene inactivation in acute lymphocytic leukemia. *Blood* 1995;15;85(12):3431-6.
128. Raycroft, L, Wu, HY, and Lozano, G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249, 1049-1051. 1990.
129. Rieder H, Fonatsch C, Freund M. Abnormalities of the short arm of chromosome 9. A nonrandom secondary aberration in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Genet.Cytogenet.* 1991;53(1):139-42.
130. Rieder H, Ludwig WD, Gassmann W, Thiel E, Loffler H, Hoelzer D et al. Chromosomal abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: results of the German ALL/AUL Study Group. *Recent Results Cancer Res.* 1993;131:133-48.
131. Rieder H, Schnittger S, Bodenstern H, Schwonzen M, Wormann B, Berkovic D et al. dic(9;20): a new recurrent chromosome abnormality in adult acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes.Cancer* 1995;13(1):54-61.
132. Rieder H, Ludwig W-D, Gassmann W, Maurer J, Janssen J, Gökbuget N et al. Prognostic Significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996;95:678-91.
133. Rieder H, Bonwetsch C, Janssen L, Maurer J, Janssen J, Schwartz S et al. High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998;12:1473-81.
134. Rieder H, Fonatsch C, Hoelzer D, and Hasenburger T. High rate of homozygous p16 deletions in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Ann.Hematol.* 80, suppl. II:S31, 2001
135. Rotter V, Ronen D. Expression of p53 in differentiation and apoptosis and its deregulation in tumor cell. *Leukemia* 1997;11 Suppl 3:327-30.
136. Rowley, J. D. The Philadelphia Chromosome Translocation. *Cancer* 65, 2178-2184. 1990.
137. Ruas, M and Peters, G. The p16Ink4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378, F115-F177. 1998.
138. Sattler M, Griffin J. Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int J Hematol* 2001;73(3):278-91.

139. Scheinberg, DA and Golde, DW. The Leukemias - Harrison's Principles of Internal Medicine. 2, 1764-1774. 1995. Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill.
140. Schröder M, Mathieu U, Dreyling M, Bohlander S, Hagemeijer A, Beverloo B et al. CDKN2 gene deletion is not found in chronic lymphoid leukaemias of B- and T-cell origin but is frequent in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1995;91:865-70.
141. Secker-Walker L, Lawler S, Hardisty R. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *British Medical Journal* 1978;2:1529-30.
142. Serra A, Gottardi E, Della RF, Saglio G, Iolascon A. Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (CDKN2) gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br.J Haematol.* 1995;91(3):625-9.
143. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-7.
144. Serrano M. The Tumor Suppressor Protein p16 INK4a. *Experimental Cell Research* 1997;237:7-13.
145. Sessarego M, Defferrari R, Fugazza G, Comelli A, Salvidio E, Ajmar F. Involvement of the short arm of the derivative chromosome 9 in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1991;52(1):43-9.
146. Shannon K. Genetic Alterations in Leukemia: Events on a Grand Scale. *Blood* 1992;80(1):1-2.
147. Sherr, CJ. Cancer Cell Cycles. *Science* 274, 1672-1677. 1996.
148. Soenen, V., Preudhomme, C., Roumier, C, Daudignon, A, Lai, J. L., and Fenaux, P. 17p Deletion in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. Analysis of Breakpoints and Deleted Segments by Fluorescence In Situ. *Blood* 91(3), 1008-1015. 1998.
149. Soenen V, Lepelley P, Gyan E, Preudhomme C, Lai JL, Bauters F et al. Prognostic significance of p16INK4a immunocytochemistry in adult ALL with standard risk karyotype. *Leukemia* 2001;15(7):1054-9.
150. Spruck CI, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, Simoneau A, Lin M, Gonzales F et al. p16 gene in uncultured tumours. *Nature* 1994;370:183-4.
151. Stock W, Sher D, Dodge R, Westbrook C, Larson R, Arthur D et al. High incidence of p16 deletion in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): correlation with clinical features and response to treatment: CALGB 8762. *Blood* 1995;86:268a.
152. Stock W, Tsai T, Golden C, Rankin C, Sher D, Slovak M et al. Cell cycle regulatory gene abnormalities are important determinants of leukemogenesis and disease biology in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95(7):2364-71.

153. Strachan T, Read A. Molekulare Humangenetik. 1ed. 1996.
154. Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R, Miyagawa K, Hagiwara K, Hirai H et al. Mutations of the p53 gene in lymphoid leukemia. *Blood* 1991;77(6):1153-6.
155. Takeuchi S, Bartram C, Seriu T, Miller C, Tobler A, Janssen J et al. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors:p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1995;86:755-60.
156. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet.* 1991;7(5):149-54.
157. Trepel M, Scheduling S, Groscurth P, Horny H, Malipiero U, Brugger W et al. A new look at the role of p53 in leukemia cell sensitivity to chemotherapy. *Leukemia* 1997;11:1842-9.
158. Tsai, T., Davalath, S, Rankin, C., Radich, JP, Herman, JG, Appelbaum, FR, and Boldt, DH. Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with de nove, relapsed or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group Studies. *Leukemia* 10, 1901-1910. 1996.
159. van Ommen GJ, Breuning MH, Raap AK. FISH in genome research and molecular diagnostics. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1995;5(3):304-8.
160. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
161. Vogelstein B, Kinzler K. *The Genetic Basis of Human Cancer*. McGraw-Hill; 1998.
162. Wada, M, Bartram, CR, Nakamura, H, Hachiya, M, Chen, DL, Borenstein, J, Miller, Carl W., Ludwig, L, Hansen-Hagge, TE, Ludwig, W-D, Reiter, A., Mizogouchi, H, and Koeffler, H. Phillip. Analysis of p53 Mutations in a Large Series of Lymphoid Hematologic Malignancies of Childhood. *Blood* 82(10), 3163-3169. 1993.
163. Walters R, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH, Trujillo J, Cork A et al. The importance of cytogenetic studies in adult acute lymphocytic leukemia. *Am.J Med.* 1990;89(5):579-87.
164. Westbrook, CA, Hooberman, AL, Spino, C, Dodge, R. K., Larson, R. A., Davey, F. R., Wurster-Hill, DH, Sobol, RE, Schiffer, C. A., and Bloomfield, C. D. Clinical Significance of the BCR-ABL Fusion Gene in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 80(12), 2983-2990. 1992.

165. Westbrook C. Molecular subsets and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1997;11(Supp.4):8-10.
166. Wetzler, M, Dodge, RK, Mrozek, K, Carroll, AJ, Tantravahi, R, Block, AW, Pettenati, MJ, Le Beau, MM, Frankel, SR, Stewart, CC, Szatrowski, TP, Schiffer, CA, Larson, RA, and Bloomfield, CD. Prospective Karyotype Analysis in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: The Cancer and Leukemia Group B Experience. *Blood* 93(11), 3983-3993. 1999.
167. Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev.* 1993;7(8):1572-83.
168. Zhu, YM, Foroni, L, McQuaker, IG, Papaioannou, M, Haynes, A, and Russell, HH. Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 79(7-8), 1151-1157. 1999.

7. Anhang

7.1 Verbrauchsmaterialien

7.1.1 Materialien zur Aufarbeitung der Proben

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
RPMI 1640	Kulturmedium, Fa. Gibco BRL/Life Technologies
Glutamin McCoy`s 5A Nutrient Mixture Ham`s F10 20% foetales Kälberserum	Kulturmedienzusätze, Fa. Gibco BRL/Life Technologies
Penicillin Streptomycin Amphotericin B	Antibiotika, Fa. Gibco BRL/Life Technologies
Thymidin	Nucleosid, Fa. Gibco BRL/Life Technologies
Colcemid®	Fa. Gibco BRL/Life Technologies

7.1.1.1 Materialien zur PAC-Klonierung und Aufarbeitung

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
Luria Bertani Nährmedium	10g Trypton 5g Hefe Extrakt 10g NaCl ad 1000 Aqua bidest auf pH 7.0 einstellen
Kanamycin	Antibiotikum, Fa. Gibco BRL/Life Technologies
Glycerinlösung	50% Glycerol 30% Aqua a.i. 10% 100 mM CaCl ₂ 10% 100 mM MgCl ₂
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)	Fa. ICN Biomedicals, CA. U.S.A.
P1-Puffer (Angaben d. Herstellers Qiagen)	50mM Tris (Tris(2 hydroxymethyl)-aminomethan)-Cl, pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A Fa. Qiagen, Hilden
P2-Puffer (Angaben d. Herstellers Qiagen)	200 mM NaOH, 1% SDS Fa. Qiagen, Hilden
P3-Puffer (Angaben d. Herstellers Qiagen)	3,0 M Natriumacetat, pH 5.5 Fa. Qiagen, Hilden

QBT-Puffer (Angaben d. Herstellers Qiagen)	750 mM NaCl 50 mM MOPS (2-(N-Morpholino) propansulfonsäure), pH 7.0 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100® Fa. Quiagen, Hilden
QC-Puffer (Angaben d. Herstellers Qiagen)	1.0 M NaCl 50 mM MOPS (2-(N-Morpholino) propansulfonsäure), pH 7.0 15% Isopropanol Fa. Quiagen, Hilden
QF-Puffer (Angaben d. Herstellers Qiagen)	1,25 M NaCl 50 mM Tris, Tris-Cl, pH 8.5 15% Isopropanol Fa. Qiagen, Hilden
Anionenaustauscherharzsäule Qiagen tip 500	Fa. Qiagen, Hilden
Isopropanol	
Ethanol 70% Aqua dest	

7.1.1.2 Materialien zur Nick-Translation

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
Aqua dest	
LiCl	
Ethanol 100%, 70%, 50%, 30%	Ethanol/Aqua dest
Formamid	Fa. Riedel de Haën, Seelze
Formamid 70%	70ml Formamid 10ml 20x SSC ad 97ml Aqua bidest pH Einstellung auf 7.0 mit 1M Hcl ad 100ml
Mastermix 20%	20ml 20% Mastermix 40ml 50% Dextransulfat 10ml 20x SSC ad 100ml Aqua dest (50% Dextransulfat: 50g Dextransulfat ad 100ml Aqua dest)
Dextransulfat	Fa. Pharmacia, Heidelberg
Herings Sperm DNA	Fa. Promega Madison, WI U.S.A.
COT 1 DNA	Fa. Gibco BRL/Life Technologies
Nick Translation Kit	Fa. Boehringer Mannheim

7.1.1.3 Materialien zur Hybridisierung/Detektion

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
20x SSC, pH 7.0	3M NaCl 0,3M Natriumcitrat mit 1 M Hcl auf pH 7.0 eingestellt
2x SSC	100ml 20x SSC 900ml Aqua dest
1x SSC	50ml 20x SSC 950ml Aqua dest
0,1x SSC	5ml 20x SSC 995ml Aqua dest
2x SSC/Triton	100ml 20x SSC 900ml Aqua dest 1ml Triton X-100 [®]
Triton X-100	Fa. Merck, Darmstadt
NaOH 0,07 mol/l	930ml H ₂ O 70ml NaOH, c(NaOH = 1mol/l)
DAPI Gebrauchslösung	5mg DAPI 25ml Aqua dest
Inkubationspuffer	96ml 4x SSC 4ml BSA 25%
Blocklösung	880µl 4x SSC 120µl BSA 25%
Objektträger	Fa. Knittel Gläser
Deckgläser (24x60; 24x24)	Fa. Menzel Gläser
Trockenblock	Fa. Schleicher & Schuell
Hybridisierungspuffer	Vysis Inc., IL, U.S.A.
Antifading Vectashield D [®]	Vector Laboratories INC, Bulingame, U.S.A.
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Fa. Boehringer, Mannheim
Fixogum [®]	Fa. Marabu, Tamm
DAPI(4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Fa. Serva, Heidelberg

7.1.1.4 Gensonden

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
CEP 9 (direktmarkiert)	Vysis Inc., IL, U.S.A.
CEP 9	Oncor
CEP 17 (direktmarkiert)	Vysis Inc., IL, U.S.A.
p53 (direktmarkiert)	Vysis Inc., IL, U.S.A.

7.1.1.5 Detektionssysteme

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
Anti-Streptavidin, biotinyliert	Vector Laboratories Inc., Bulingame, U.S.A.
FITC-konjugiertes Streptavidin	Vector Laboratories Inc., Bulingame, U.S.A.
Anti-Digoxigenin aus Maus	Fa. Boehringer, Mannheim
Texas Red Rat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Baltimore, U.S.A.
Texas Red Donkey Anti-Rat IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Baltimore, U.S.A.

7.1.2 Geräte und sonstige Materialien

Material	Inhalt/Herstellung/Hersteller
Brutschrank	Fa. Heraeus, Hanau
Mikro Rapid/K Zentrifuge	Fa. Hettich, Tuttlingen
Fluoreszenzmikroskop	Fa. Zeiss, Jena
Phasenkontrastmikroskop	Fa. Zeiss, Jena
Steril-Werkbank Laminar Air	Fa. Heraeus, Hanau
Wärmeplatte	Fa. Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf, Hamburg
Rüttler	Fa. Eppendorf, Hamburg

7.2 Daten zur FISH-Auswertung

Abbildung 7.1: Zusammenschau der Charakteristika aller untersuchten Patienten

Pat.Nr.	Immunotyp	Material	p53	p16	Diagnose	Alter	Sex
001/92	C-ALL	B/Mix 72	x	HoDe	ED	34	m
72/92	C-ALL,My+	K/Mix 48	x	x	ED	47	m
227/92	C-ALL	K/Mix 24	x	n.u.	ED	49	w
317/92	pro-B-ALL	B/Mix 24	HeDe	x	ED	40	m
352/92	C-ALL	B/R24	x	HoDe	ED	61	m
472/92	C-ALL	B/R+T	x	HeDe	ED	28	m
566/92	C-ALL	K/R+T72	x	x	ED	39	m
109/93	C-ALL	B/R+T48	x	x	ED	64	w
155/93	C-ALL	K/Mix 72	x	x	ED	31	m
468/93	C-ALL	K/R+T4	x	HeDe	ED	53	m
232/94	C-ALL	KM R24+T	x	HoDe	ED	31	m
617/94	C-ALL	KM R24 Mix	x	HoDe	ED	54	w
187/96	C-ALL	KM/R48+T	x	x	ED	43	w
188/96	C-ALL	B/48h Mix	n.u.	HoDe	ED	57	m
216/96	C-ALL	K/Mix 24	x	x	ED	64	w
244/96	C-ALL	K/R 24	x	x	ED	64	m
250/96	C-ALL	KM/R4+T	x	x	ED	33	m
304/96	C-ALL	KM 24hMix	x	HoDe	ED	52	w
330/96	prä-B-ALL	KM 24hMix	x	HoDe	ED	48	m
357/96	C-ALL	KM/R4+T	Tris	x	ED	19	w
358/96	C-ALL	KM 24h Mix	x	x	ED	73	w
14/97	C-ALL	B/Mix 24	x	x	ED	37	w
61/97	pro-B-ALL	K/Mix 24	x	x	ED	57	m
169/97	C-ALL	B/Mix24	x	n.u.	ED	39	m
171/97	C-ALL	B/M+T24	x	x	ED	58	w
230/97	C-ALL	K/Mix 48	x	n.u.	ED	52	m
27/98	prä-B-ALL	KM/R4+T	x	x	ED	56	m
31/98	C-ALL	KM 72	x	x	ED	69	w
231/98	C-ALL	KM24Mix	n.u.	HoDe	1.Rez.	36	m

Erläuterungen:

Immunotyp:

My+= Myeloid-Antigen positiv
nd= nicht diagnostiziert

Material:

K= Knochenmark
B= peripheres Blut
R= Glutamin
M= McCoy's 5A
T= Thymidin
Mix= Nutrient Mixture Ham's F10

p53/p16:

x= vorhanden
n.u.= nicht untersucht
HeDe= hemizygote Deletion
HoDe= homozygote Deletion

Diagnose:

ED= Erstdiagnose
Rez.= Rezidiv

Abbildung 7.1: (Fortsetzung Zusammenschau Charakteristika aller Patienten)

Pat.Nr.	Karyotyp
001/92	47,XY,t(1;14;12;der(9)t(9;22)(q34;q11))(q23;q32;q13;p13)
72/92	51-53,XY,+X,+8,t(9;22)(q34;q11),+21,+22,+1-3xder(22)t(9;22)(q34;q11)
227/92	55-56,XX,+X,+2,+4,+6,+8,t(9;22)(q34;q11),+11,+14,+19,+21,+der(22)t(9;22)(q34;q11)
317/92	46,XY,dup(1)(q23q32),t(9;22)(q34;q11),del(16)(q11),i(17)(q10)
352/92	48,XY,+X,+8,der(9)t(9;22)(q34;q11),ider(22)t(9;22)(q34;q11)
472/92	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
566/92	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
109/93	46;XX,t(9;22)(q34;q11),i(7)(q10)
155/93	45,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)dic(9;20)(p11;q11.1),der(22)t(9;22)(q34;q11)
468/93	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
	zusätzlich: 45,XY,-7,i(8)(q10),ider(9)t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)(q34;q11)
232/94	46,XY,ider(9)t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)(q34;q11)
617/94	46,XX,der(9)t(9;22)(q34;q11)del(9)(p11),der(22)t(9;22)(q34;q11)
187/96	46,XX,(t9;22)(q34;q11)
188/96	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
216/96	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
244/96	58,XXY,-1,-2,-3,-5,-8,-9,add(9)(q3?4),-11,-13,-15,-16,-17,-20,der(22)t(22;?)(q?11;?),+der(22)
250/96	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
304/96	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
330/96	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
	zusätzl.: 47,XY,t(1;6)(p26;p12),t(9;22)(q34;q11),der(9)t(3;9)(p?;p?),del(11)(q23),+der(22)t(9;22)
357/96	52,XX,+?4,t(9;22)(q34;q11),+?14,+?15,+?17,+?20,+der(22)t(9;22)
358/96	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
14/97	46,XXt(9;22)(q34;q11)
61/97	47,XYt(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)
169/97	47,XY,i(8)(q10),+i(8)(q10),t(9;22)(q34;q11)
171/97	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
230/97	46,XY,(t9;22)(q34;q11) (inc)
27/98	45,XY,?dic(12;19)(p1?1;p1?3),der(22)t(9;22)(q34;q11)
31/98	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
231/98	46,XY,2xder(9)t(8;9)(q11;p13)t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)

Karyotyp:

Bei einigen Patienten ließen sich zytogenetisch mehr als nur ein dominierender Karyotyp nachweisen. In diesen Fällen wird der zusätzlich gefundene Karyotyp ebenfalls aufgeführt.

Abbildung 7.2: Auswertung der Kontrollen

Kontrolle TP53:

Nummer	Summe	%	1/1	%	1/2	%	1/3	%	2/0	%	2/1	%	2/2	%	2/3	%	2/4	%	2/5
05121997	231	0,9	2	3	7	0	0	0	0	5,2	12	87	200	1,7	4	0	0	0,4	1
26111997	231	0	0	1,7	4	0	0	0,4	1	4,8	11	87	200	3	7	1,7	4	0	0
12111997	241	0,8	2	2,5	6	0	0	0,4	1	5	12	83	200	6,6	16	0,4	1	0	0
28011998	222	2,7	6	1,8	4	0	0	0	0	3,6	8	90	200	0	0	0	0	0	0
01021998	218	0	0	5,1	11	0	0	0	0	2,3	5	92	200	0,5	1	0	0	0	0
19041998	221	0,5	1	2,2	5	0	0	0	0	0,9	2	92	204	1,4	3	0	0	0	0
23051998	216	0	0	1,4	3	0,5	1	0	0	1,4	3	95	205	0,9	2	0	0	0	0
Mittelwert		0,7	1,6	2,5	5,7	0,1	0,1	0,1	0,3	3,3	7,6	89	201	2	4,7	0,3	0,7	0,1	0,1
Standard-abweichung		1	2,1	1,2	2,7	0,2	0,4	0,2	0,5	1,8	4,3	4,1	2,2	2,3	5,5	0,6	1,5	0,2	0,4
3xSD		2,9	6,4	3,7	8,1	0,5	1,1	0,6	1,5	5,3	13	12	6,6	6,8	16	1,9	4,5	0,5	1,1
MW+3xSD		4		6		1		1		9		102		9		2		1	

Kontrolle p16:

Nummer	Summe		0/2		1/1		1/2		1/3		2/0		2/1		2/2		2/3		2/4
05121997	243	0	0	2,9	7	2,1	5	0	0	0,4	1	11	27	82	200	0	0	0	0
12111997	233	0	0	0,9	2	0,9	2	0	0	0,9	2	5,6	13	86	200	2,1	5	0	0
28011998	219	0	0	0,9	2	0,9	2	0	0	0	0	3,7	8	92	202	0	0	0,5	1
01021998	232	1,3	3	0	0	0,4	1	0,4	1	1,3	3	0	0	86	200	1,3	3	0,4	1
19041998	218	0,9	2	0	0	1,4	3	0	0	0	0	1,4	3	92	200	0	0	0	0
23051998	228	0,4	1	1,3	3	6,1	14	0	0	0	0	1,8	4	88	201	0	0	0	0
Mittelwert		0,4	1	1,0	2,3	2	4,5	0,1	0,2	0,4	1	3,9	9,2	88	201	0,6	1,3	0,1	0,3
Standard-abweichung		0,6	1,3	1,1	2,6	2,1	4,8	0,2	0,4	0,5	1,3	4	9,8	3,8	0,8	0,9	2,2	0,2	0,5
3xSD		1,7	3,8	3,2	7,8	6,4	15	0,5	1,2	1,6	3,8	12	29	11	2,5	2,8	6,5	0,7	1,5
MW+3xSD		2		4		8		1		2		16		99		3		1	

Erläuterungen:

Nummer: Identifikationsnummer für jede Kontrolle

Summe: Summe aller gezählten Signalkombinationen bei einer Kontrolle

%: Prozentanteil der in der nachfolgenden Spalte aufgeführten Signalkombination an allen Signalen

x#x: Anzahl der Tumorsuppressorgensondensignale # Anzahl Zentromersignale

3xSD: Dreifache Standardabweichung

MW+3xSD: Mittelwert + dreifache Standardabweichung (gerundet)

Anmerkung für die Untersuchung von TP53, p16 und den Kontrollen:

Angeführt sind lediglich die Signalkombinationen, die tatsächlich gefunden worden sind. Da bei allen Untersuchungen, insbesondere jedoch bei den Kontrollen, nicht für alle rechnerisch möglichen Kombinationen Werte nachweisbar waren, variiert die Anzahl der Spalten mit den Signalkombinationen. Alle nicht aufgeführten Kombinationen waren in der visuellen Auswertung mit 0#0 befundet worden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und gleichzeitig fehlender Relevanz wurden sie hier nicht mit aufgeführt.

Abbildung 7.2: (Fortsetzung Auswertung der Kontrollen)

Kontrolle TP53:

Nummer	%	3/1	%	3/2	%	3/3	%	3/5	%	4/4
05121997	0	0	2,2	5	0	0	0	0	0,4	1
26111997	0,4	1	0,9	2	0	0	0,4	1	0	0
12111997	0,8	2	0,4	1	0	0	0	0	0	0
28011998	0,9	2	0,9	2	0	0	0	0	0	0
01021998	0	0	0,5	1	0	0	0	0	0	0
19041998	0	0	1,4	3	1,4	3	0	0	0	0
23051998	0,5	1	0	0	0,5	1	0	0	0	0
Mittelwert	0,4	0,9	0,9	2	0,3	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1
Standard-abweichung	0,4	0,9	0,7	1,6	0,5	1,1	0,2	0,4	0,2	0,4
3xSD	1,2	2,7	2,1	4,9	1,5	3,4	0,5	1,1	0,5	1,1
MW+3xSD	2		3		2		1		1	

Kontrolle p16:

Nummer	%	3/1	%	3/2	%	3/3	%	4/2	%	4/3	%	4/4
05121997	0,8	2	0,4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12111997	0,9	2	2,1	5	0	0	0,4	1	0	0	0,4	1
28011998	0	0	1,8	4	0	0	0	0	0	0	0	0
01021998	0	0	6,5	15	0,4	1	1,7	4	0	0	0	0
19041998	0	0	3,2	7	0	0	0,5	1	0	0	0,9	2
23051998	0	0	1,8	4	0	0	0	0	0,4	1	0	0
Mittelwert	0,3	0,7	2,6	6	0,1	0,2	0,4	1	0,1	0,2	0,2	0,5
Standard-abweichung	0,4	1	2,1	4,8	0,2	0,4	0,7	1,5	0,2	0,4	0,4	0,8
3xSD	1,3	3,1	6,2	14	0,5	1,2	2	4,6	0,5	1,2	1,1	2,5
MW+3xSD	2		9		1		2		1		1	

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Harald Rieder für die Überlassung der vorliegenden Arbeit und für seine Unterstützung und Förderung in den nachfolgenden Jahren. Als Ansprechpartner hat er mir jederzeit mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite gestanden.

Ein herzlicher Dank für die tatkräftige Unterstützung gilt auch den medizinisch technischen Assistenten Frau Alice Warnowitz, Frau Ina Bachmann sowie Herrn Harald Balz, deren Fachkenntnisse und Geduld mir oft weitergeholfen haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern Luzie und Artur Hasenburg für ihre verlässliche moralische und materielle Unterstützung während meines Studiums.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Nachweis von Deletionen der Tumorsuppressorgene TP53 und p16 mittels Fluoreszenz In Situ Hybridisierung bei erwachsenen Patienten mit Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL)" im medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter Leitung des Geschäftsführenden Direktors, Prof. Dr. H.Grzeschik, mit Unterstützung durch Professor Dr. H. Rieder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

10. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Aurich, Bauer, Basler, Baum, Beato, Ehlenz, Engel, Eschenbach, Feuser, Ganz, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hoffmann, Huffmann, Joseph, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Kummer, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mannherz, Meyer-Breiting, Oertel, Penzel, Peter, Pfab, Podszus, Pohlen, Portig, Remschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Seifart, Schulz, Thomas, von Wichert.

Meine akademischen Lehrer in Köln waren die Herren:

Beyer, Bröker, Hossmann, Horsch, Pinger, Terpe.